Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Unidad de Posgrado

Caracterización molecular de bacterias ácido lácticas aisladas de frutos procedentes de la Región Loreto

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Biotecnología

AUTOR

Johanna Fabiola SÁNCHEZ DÁVILA

ASESOR

Dra. Amparo Iris ZAVALETA PESANTES

Lima, Perú

2019

Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Sánchez, J. Caracterización molecular de bacterias ácido lácticas aisladas de frutos procedentes de la Región Loreto [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Farmacia y Bioquímica, Unidad de Posgrado; 2019.

HOJA DE METADATOS COMPLEMENTARIOS

Código Orcid del autor (dato opcional): 0000-0002-5999-0817

Código Orcid del asesor o asesores (dato obligatorio): 0000-0003-3844-7185

DNI del autor: 18197550

Grupo de investigación: Biotecnología Microbiana y Salud (BIOMIAS)

Institución que financia parcial o totalmente la investigación: INNOVATE PERU - FONDECYT

Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación. Debe incluir localidades y coordenadas geográficas

Iquitos (Mercado Belén): Longitud O73º15´13.79¨, Latitud: S3º44´56.83¨

Lima (Cercado): Longitud O77º1´41.66¨, Latitud S12º2´55.45¨

Año o rango de años que la investigación abarcó:

2016-2017

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
UNIDAD DE POSGRADO

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA

Siendo las **10.30 hrs. del 05 de abril de 2019** se reunieron en el auditorio de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado Examinador y Calificador de tesis, presidido por la Dra. Karim Lizeth Jiménez Aliaga e integrado por los siguientes miembros: Dra. Amparo Iris Zavaleta Pesantes (Asesora), Dr. Roberto Jhalver Vega Paulino y Mg. Ruth Liliana Cristóbal Delgado; para la sustentación oral y pública de la tesis intitulada: **"CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AISLADAS DE FRUTOS PROCEDENTES DE LA REGIÓN LORETO"**, presentada por la Bachiller en Ciencias Biológicas **JOHANNA FABIOLA SÁNCHEZ DÁVILA.**

Acto seguido se procedió a la exposición de la tesis, con el fin de optar al Grado Académico de **Magíster en Biotecnología**. Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por la graduando.

A continuación el Jurado de tesis procedió a la calificación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:

DIECINUEVE (19) EXCELENTE

Luego, la Presidenta del Jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue a la Bachiller en Ciencias Biológicas **JOHANNA FABIOLA SÁNCHEZ DÁVILA**, el Grado Académico de Magíster en **Biotecnología.**

Siendo las 11.40 hrs. se levanta la sesión.

Se extiende el acta en Lima, a las 11.50 hrs. Del 05 de abril de 2019.

Dra. Karim Lizeth Jiménez Aliaga ((P. Aux. T.C.)
Presidenta

Dra. Amparo Iris Zavaleta Pesantes (P.P., T.C.)
Miembro - Asesora

Dr. Roberto Jhalver Vega Paulino (P. Aux. T.C.)
Miembro

Mg. Ruth Liliana Cristóbal Delgado
Miembro

Observaciones:

.....

Jr. Puno 1002 – Lima 1
Apartado Postal 4559 Lima 1

Teléfono: 619-7000 anexo 4812
Email:upg.farmacia@unmsm.edu.pe

AGRADECIMIENTO

A Dios, por su presencia constante en todos los momentos de mi vida.

A la Dra. Amparo Zavaleta Pesantes, por su asesoría y la oportunidad brindada para la realización de la presente investigación en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioquímica.

Al Dr. Carlos Vegas Perez, por su valiosa colaboración y sus sugerencias para la realización de los ensayos que forman parte de la presente investigación

A los miembros del Jurado evaluador, por sus sugerencias y todo el apoyo brindado para la revisión y sustentación de la presente tesis.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioquímica por su amistad, sus consejos y por las facilidades brindadas para la realización de la presente investigación.

DEDICATORIA

A Arturo, mi querido esposo

por su amor y apoyo permanente para hacer realidad este sueño que parecía tan lejano

A Alberto y Faviola, mis queridos padres

por su amor incondicional y la confianza que siempre depositan en mí

A Karla y Laly, mi querida hermana y sobrina

por su amor y su alegría que siempre fueron una hermosa motivación

A Feli, Luna, Tom, Mía y Charly

por su ternura y constante compañía

El presente trabajo de tesis fue financiado parcialmente por los Proyectos INNOVATE PERU 230- FINCyT-IA-2013 y 007-2014-FONDECyT

INDICE

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN 1

1.1. Situación problemática 1
1.2. Formulación del problema 2
1.3. Justificación teórica 3
1.4. Justificación práctica 4
1.5. Objetivos 5
1.5.1. Objetivo general 5
1.5.2. Objetivos específicos 5

CAPITULO II. MARCO TEÓRICO 6

2.1. Antecedentes de la investigación 6
2.1.1. Del aislamiento de BAL a partir de frutos 6
2.1.2. De la caracterización fenotípica y molecular de BAL 8
2.2. Bases teóricas 9
2.2.1. Clasificación de las BAL 9
2.2.2. Metabolismo de las BAL 10
2.2.3. Ecología de las BAL 13
2.2.4. Principales géneros de BAL 14
2.2.5. Metabolitos de interés biotecnológico producidos por las BAL 16
2.2.6. Métodos para la identificación y caracterización de BAL 20

CAPITULO III. METODOLOGÍA 26

3.1. Recolección de muestras 26
3.2. Aislamiento de BAL 27
3.2.1. Pre-enriquecimiento 27
3.2.2. Aislamiento primario 27
3.2.3. Aislamiento en cultivo puro 27
3.3. Identificación preliminar de BAL 27
3.4. Selección de BAL 28
3.5. Caracterización fenotípica de BAL 28
3.5.1. Observación macroscópica y microscópica 28
3.5.2. Pruebas nutricionales 28
3.5.3. Pruebas fisiológicas 29
3.5.4. Actividad hidrolítica 30
3.5.5. Prueba de sensibilidad antimicrobiana 30
3.6. Caracterización molecular de BAL 31
3.6.1. Extracción de ADN genómico 31

3.6.2. Análisis de perfiles de restricción de ADNr amplificado por PCR (ARDRA) 31
3.6.3. Análisis de restricción de los espaciadores intergénicos 16S – 23S (RISA) 33
3.6.4. Amplificación de secuencias genómicas repetidas (rep-PCR) 34
3.6.5. Secuenciamiento de los genes ribosómicos 16S e identificación de las BAL aisladas 35
3.6.6. Amplificación del gen *rec*A para la diferenciación de *Lactobacillus plantarum, L. pentosus y L. paraplantarum.* 35
3.7. Potencial biotecnológico de las BAL 36
3.7.1. Producción de exopolisacáridos 36
3.7.2. Producción de ácido láctico 37

CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 38

4.1. Resultados 38
4.1.1. Aislamiento y selección de BAL 38
4.1.2. Caracterización fenotípica 44
4.1.3. Caracterización molecular 49
4.1.4. Evaluación del potencial biotecnológico 64
4.2. Discusión 66
4.2.1. Del aislamiento y selección de BAL 66
4.2.2. De la caracterización fenotípica 68
4.2.3. De la caracterización molecular 75
4.2.4. Del potencial biotecnológico 81

CAPITULO V. CONCLUSIONES 85

CAPITULO VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 86

CAPITULO VII. ANEXOS 104

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Lista de frutos usados en el presente estudio

Tabla 2. Características fenotípicas de BAL aisladas de frutos procedentes de la Región Loreto

Tabla 3. Perfiles fenotípicos de las BAL aisladas de frutos de la Región Loreto

Tabla 4. Perfiles genéticos de las BAL aisladas de frutos de la Región Loreto

Tabla 5. Análisis de las secuencias de los genes ribosómicos 16S de las BAL aisladas de frutos de la Región Loreto

Tabla 6. Número de acceso de las secuencias de genes ribosómicos 16S de cepas bacterianas utilizadas en la construcción del árbol filogenético de las BAL aisladas de frutos de la Región Loreto

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Bacilos Gram positivos por microscopía 1000 X

Figura 2. BAL productoras de acidez sobre agar MRS + $CaCO_3$

Figura 3. Cultivos de BAL en agar MRS

Figura 4. Tipo de metabolismo de las BAL aisladas de frutos de la Región Loreto

Figura 5. Fermentación de carbohidratos por BAL aisladas de frutos de la Región Loreto

Figura 6. Crecimiento de BAL aisladas de frutos de la Región Loreto a diferentes condiciones de pH, sal y temperatura.

Figura 7. Prueba de sensibilidad antimicrobiana de las BAL aisladas de frutos de la Región Loreto.

Figura 8. Gel de agarosa 1 % conteniendo ADN genómico de BAL aisladas de frutos de la Región Loreto.

Figura 9. Gel de agarosa 1 % conteniendo los genes ribosómicos 16S amplificados de BAL aisladas de frutos de la Región Loreto.

Figura 10. Gel de agarosa 2,5 % mostrando los perfiles de restricción de los genes ribosómicos 16S amplificados y digeridos con *Alu*I de las BAL aisladas.

Figura 11. Gel de agarosa 2,5 % mostrando los perfiles de restricción de los genes ribosómicos 16S amplificados y digeridos con *Hae*III de las BAL aisladas.

Figura 12. Gel de agarosa 2,5 % mostrando los perfiles de restricción de los genes ribosómicos 16S amplificados y digeridos con *Mse*III de las BAL aisladas.

Figura 13. Gel de agarosa 2,5 % conteniendo los espaciadores intergénicos 16S-23S de las BAL aisladas.

Figura 14. Gel de agarosa 2,5 % conteniendo los perfiles de restricción del segmento ITS 16S- 23S de las BAL aisladas.

Figuras 15 y 16. Gel de agarosa 1 % conteniendo los perfiles de rep-PCR de BAL aisladas de frutos de la Región Loreto.

Figura 17. Arbol filogenético de BAL aisladas de frutos de la Región Loreto basado en las secuencias de los genes ribosómicos 16S.

Figura 18. Gel de agarosa 1 % conteniendo gen *recA* de BAL pertenecientes al grupo I aisladas de frutos de la Región Loreto

Figura 19. BAL aisladas de frutos de la Región Loreto productoras de EPS

Figura 20. BAL aisladas de frutos de la Región Loreto productoras de ácido láctico.

RESUMEN

Con la finalidad de caracterizar molecularmente bacterias ácido lácticas, se colectaron 14 frutos procedentes de la Región Loreto a partir de los cuales se aislaron y seleccionaron 39 bacterias ácido lácticas las cuales fueron caracterizadas fenotípica y molecularmente y se evaluó su potencial biotecnológico para la producción de exopolisacáridos y ácido láctico. La caracterización fenotípica se realizó mediante pruebas nutricionales, fisiológicas y determinación de la sensibilidad antimicrobiana. La caracterización molecular se efectuó mediante las técnicas ARDRA, RISA y rep-PCR y la identificación de los aislados por el secuenciamiento de los genes ribosómicos y la amplificación del gen *rec*A. Según las pruebas fenotípicas los aislados fueron divididos en tres grupos que se diferenciaron por la morfología celular, el tipo de metabolismo, el patrón de fermentación de carbohidratos, el crecimiento en NaCl 10% y la sensibilidad a novobiocina, bacitracina y penicilina. La caracterización molecular de las BAL mediante ARDRA y RISA evidenció cuatro perfiles de restricción y por rep-PCR se detectaron 14 genotipos, demostrándose la presencia de diversidad intraespecífica en los aislados. Según el análisis de las secuencias nucleotídicas de los genes ribosómicos 16S y la amplificación del gen *rec*A, los 39 aislados fueron identificados como *Lactobacillus plantarum* (30), *Lactobacillus brevis* (3), *Weissella cibaria* (5) y *Weissella confusa* (1). La evaluación del potencial biotecnológico indica que las cepas *L. plantarum* y de ambas especies de *Weissella* tendrían potencial para la producción de ácido láctico y exopolisacáridos, respectivamente; pero que debe ser evaluado de manera cuantitativa y en mayor detalle para su posible aprovechamiento.

Palabras clave: Frutos amazónicos, *Lactobacillus plantarum, Weissella,* ARDRA, RISA, rep-PCR

ABSTRACT

In order to molecularly characterize lactic acid bacteria, 14 fruits were collected from the Loreto Region from which 39 lactic acid bacteria were isolated and selected. Isolates were phenotypically and molecularly characterized and their biotechnological potential was evaluated for exopolysaccharides and lactic acid production. Phenotypic characterization was performed through nutritional, physiological and antimicrobial susceptibility tests. Molecular characterization was performed by ARDRA, RISA and rep-PCR. Identification was carried out by 16S ribosomal genes sequencing and amplification of *rec*A gene. Based on the phenotypic tests the isolates were divided into three groups that were differentiated by cell morphology, type of metabolism, carbohydrate fermentation pattern, growth in 10% NaCl and sensitivity to novobiocin, bacitracin and penicillin. The molecular characterization of BAL by ARDRA and RISA showed four restriction profiles and by means of rep-PCR, 14 genotypes were detected, demonstrating the presence of intraspecific diversity in the isolates. By sequencing the 16S ribosomal genes and recA gene amplification, the 39 isolates were identified as *Lactobacillus plantarum* (30), *Lactobacillus brevis* (3), *Weissella cibaria* (5) and *Weissella confusa* (1). The evaluation of biotechnological potential indicates that *L. plantarum* and both *Weissella* species would have potential for the production of lactic acid and exopolysaccharides, respectively; but that it must be evaluated quantitatively for its possible use.

Key words: Amazonian fruits, *Lactobacillus plantarum, Weissella*, ARDRA, RISA, rep-PCR

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN

1.1. Situación problemática

Los microorganismos son el grupo más diverso y abundante de la tierra, constituyendo el 60 % de toda la biomasa. Los reportes más recientes indican que el suelo y los océanos contienen entre 4 a 5 x 10^{30} y 3 a 6 x 10^{29} células microbianas respectivamente (Ferrer et al., 2008; Horner-Devine et al., 2004; Sogin et al., 2011). A pesar de su diversidad, abundancia y gran variedad de metabolitos con aplicaciones biotecnológicas que son producidos a partir de ellos, los microorganismos constituyen un tesoro aun subexplotado si se tiene en cuenta que actualmente sólo el 1 % del total de microorganismos ambientales ha sido cultivado; por lo tanto, el 99 % es desconocido al igual que su potencial biotecnológico (Tsiamis et al., 2014)

Actualmente, la mayoría de productos de fermentados provienen de microorganismos que han sido aislados de diversas fuentes y cultivados en el laboratorio para su posterior aprovechamiento (Singh, 2010). En ete contexto, las frutas frescas albergan en su superficie diversos microorganismos muchos de los cuales son benignos y cumplen un rol ecológico importante. Las diversas investigaciones relacionadas al aislamiento de microorganismos procedentes de frutos en muchos casos están orientadas a patógenos responsables de su deterioro; sin embargo, la exploración de la gran diversidad de microorganismos benéficos con potencial biotecnológico, como las bacterias ácido lácticas (BAL), es aun escasa.

La Región Loreto es una zona atractiva para el aislamiento de microorganismos debido a que presenta microclimas variados y nichos ecológicos peculiares que incrementan la posibilidad de aislar bacterias con diferentes propiedades biotecnológicas e incluso especies aun no descritas. Así, las 162 especies de frutos consumidos por los pobladores locales (Gonzales, 2007) crecen en condiciones que pueden favorecer el desarrollo de una amplia diversidad de bacterias.

Dentro de los microorganismos de interés biotecnológico, las BAL son de especial relevancia. En el medio ambiente, son importantes en la fermentación espontánea de materiales orgánicos que contienen monosacáridos y disacáridos, proceso que es reconocido desde tiempos ancestrales como método de bioconservación de alimentos (Ramírez et al., 2011). Las BAL inhiben un gran número de microorganismos patógenos como *Listeria monocytogenes, Salmonella,* entre otros debido a la producción de ácidos láctico y acético, peróxido de hidrógeno, diacetilo, acetoína, péptidos antifúngicos, bacteriocinas y otros metabolitos secundarios que debido a su actividad se utilizan como bioconservantes de productos alimenticios, incluyendo productos lácteos como quesos, frutas y verduras (Cheong et al., 2014; Siroli et al., 2015; Trias et al., 2008). En la industria, las BAL se incluyen exitosamente como probióticos en alimentos funcionales y nutracéuticos (Quinto et al., 2014), así como en la producción de ensilados para alimentación de animales (Weinberg & Ashbell, 2003). Recientemente se está estudiando el potencial de las BAL como biorefinerías para la producción de biocombustibles y ácidos orgánicos (Mazzoli et al., 2014).

Las propiedades de las BAL y los diversos metabolitos que ellas producen tienen un gran potencial biotecnológico que ha sido poco explotado en nuestro medio. Para lograrlo, el primer paso es el aislamiento, la identificación y la caracterización mediante técnicas fenotípicas y moleculares. Las técnicas fenotípicas constituyen los métodos clásicos de identificación, permiten la detección de diversos caracteres expresados por las bacterias, pero presentan limitaciones ya que las cepas de una misma especie no siempre muestran características homogéneas. Por otra parte, las técnicas moleculares se basan en el estudio del material genético de los microorganismos, por lo tanto tienen la ventaja de ser: específicas, sensibles y rápidas (Palomino-Camargo & González-Muñoz, 2014).

1.2. Formulación del problema

¿Es posible aislar y caracterizar molecularmente bacterias ácido lácticas, de interés biotecnológico, a partir de frutos procedentes de la Región Loreto?

1.3. Justificación teórica

Según información del Ministerio del Medio Ambiente, el Perú es uno de los 17 países que alberga mayor biodiversidad del planeta (MINAM, 2014) y aun cuando es más frecuente hablar de diversidad de especies de flora y fauna, esta también incluye a los microorganismos. Los mapas sobre evolución muestran que la principal diversidad de la vida es la microbiana (Tripathi et al., 2007).

La diversidad microbiana es una gran fuente para la exploración biotecnólogica de nuevos organismos, productos y procesos. Así, los microorganismos son la fuente de mayor material biológico para el desarrollo de drogas, vacunas, productos farmacéuticos, compuestos químicos de interés industrial, etc. de amplia aplicación en diversos sectores productivos.

El desarrollo de la biotecnología se basa pues en la diversidad de microorganismos, y los metabolitos que ellos producen como consecuencia de su metabolismo (primario o secundario) y la conservación de los recursos genéticos que ellos proveen. Adicionalmente, el desarrollo de los métodos de ADN recombinante, el creciente número de genomas disponibles y la ingeniería genética ofrecen hoy a los científicos la posibilidad de manipular estos microorganismos logrando así una mejora en la producción de metabolitos específicos.

La identificación y la caracterización de microorganismos permiten conocer el fenotipo y el genotipo de especies bacterianas, incluso aquellas aun no reportadas, y de esa manera contribuyen al aprovechamiento de nuestra biodiversidad, en muchos casos poco valorada. En ese sentido, la Amazonía Peruana presenta características ambientales únicas de temperatura, humedad, precipitaciones, etc., por lo tanto es una fuente potencial de nuevos microorganismos productores de metabolitos de alto valor agregado.

Solo si conocemos nuestra diversidad microbiana, estaremos en la capacidad de valorarla y aprovecharla.

1.4. Justificación práctica

Las BAL han sido usadas en aplicaciones industriales principalmente como iniciadores en la fermentación de diversos productos alimenticios, agentes biocontroladores, probióticos, entre otros. Adicionalmente a las aplicaciones tradicionales, las BAL poseen muchas características que hacen de ellas candidatas potenciales para su uso en biorefinerías con el fin de convertir la biomasa derivada de vegetales en biocombustibles y productos de alto valor agregado (Mazzoli et al., 2014).

Las características fisiológicas de las BAL que permiten diversas aplicaciones biotecnológicas según Mazzoli et al. (2014) son:

a) Las BAL son consideradas como GRAS (generally regarded as safe), por lo cual su uso en bioprocesos es seguro.
b) Son microorganismos robustos adaptados a condiciones de estrés en procesos industriales. Así, muestran alta tolerancia ácida (pueden sobrevivir a valores de pH menores de 5) y amplio rango de temperatura (de 20 °C a 45 °C)
c) Metabolizan numerosos monosacáridos (hexosas y pentosas) y disacáridos, dependiendo del género, especie y cepa.
d) Producen metabolitos con aplicaciones industriales. Por ejemplo, moléculas antimicrobianas (bacteriocinas), aromatizantes y saborizantes (diacetil y acetaldehído), complementos alimenticios (vitaminas), viscosantes (exopolisacáridos), edulcorantes (manitol), moléculas nutracéuticas (ácido gamma aminobutírico (GABA)), péptidos opioides, ácidos orgánicos (ácido láctico), compuestos químicos con aplicaciones en la manufactura de polímeros plásticos (ácido poliláctico (PLA) o ptereftalato de polietileno (PET) o como solventes o biocombustibles (etil lactato, etanol, butanol), así como plásticos biodegradables (polihidroxyalcanoatos) alternativos a los derivados de la industria petroquímica.

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivo general

Caracterizar molecularmente bacterias ácido lácticas aisladas de frutos procedentes de la Región Loreto para su aplicación en futuros procesos biotecnológicos.

1.5.2. Objetivos específicos

- Aislar bacterias ácido lácticas a partir de frutos procedentes de la Región Loreto
- Caracterizar fenotípicamente las BAL seleccionadas
- Caracterizar molecularmente las BAL seleccionadas.
- Evaluar el potencial biotecnológico de las BAL para la producción de ácido láctico y exopolisacáridos.

CAPITULO II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la investigación

2.1.1. Del aislamiento de BAL a partir de frutos

En Portugal, Chambel et al. (2006) aislaron siete cepas de bacterias lácticas a partir de higos maduros y las caracterizaron usando técnicas de hibridación de ADN, perfil de proteínas totales, habilidad para fermentar carbohidratos, características microbiológicas de crecimiento, perfil enzimático y RFLPs. El análisis filogenético basado en la secuencia del gen ARNr 16S permitió identificar una nueva especie denominada *Leuconostoc pseudoficulneum sp. nov*.

Bae et al. (2006) aislaron BAL de uvas vineras procedentes de varios viñedos de Australia utilizando diferentes métodos de enriquecimiento debido a la reducida población de BAL que se encuentra naturalmente en estos frutos. Los géneros aislados fueron identificados molecularmente como *Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus* y *Weissella*.

Sedano (2006) aisló 81 lactobacilos con actividad inhibitoria y tolerantes al etanol del "masato", una bebida tradicional a base de yuca procedente de la selva peruana. Los lactobacilos fueron identificados como: *Lactobacillus plantarum* (41 %), *L. alimentarius* (16 %), *L. acidophilus* (15 %), *L. casei* (11 %) y en menor porcentaje *L. brevis*, *L. delbrueckii*, *L. fermentum*, *L. amylophilus* y *L. coryniformis*. *L. plantarum* M4 fue productor de un antimicrobiano con espectro reducido. Asimismo, las cepas de *Lactobacillus* mostraron un alto nivel de tolerancia a etanol.

Nyanga et al. (2007) aislaron e identificaron levaduras y BAL de *masau*, un fruto silvestre procedente de Zimbabwe utilizando métodos fisiológicos y moleculares.

Entre las BAL, las especies predominantes fueron *Lactobacillus agilis y L. plantarum.*

Trias et al. (2008) aislaron cepas de BAL de frutas y vegetales frescos y comprobaron su habilidad para inhibir el crecimiento de patógenos causantes de enfermedades transmitidas por los alimentos en manzanas y lechugas. Los 18 aislados mostraron capacidad antagonista contra los patógenos mencionados y fueron identificados mediante secuenciamiento del gen ARNr 16S y API 50 CH. La mayoría de las cepas pertenecieron a los géneros *Leuconostoc* y *Lactobacillus* y algunas a *Weissella* y *Lactococcus*.

Di Cagno et al. (2010) aislaron levaduras y BAL a partir de piñas y emplearon las cepas para prolongar la vida útil de esta fruta, manteniendo sus características sensoriales y nutritivas. Las cepas de BAL aisladas fueron identificadas como *Lactobacillus plantarum* y *L. rossiae.*

En Taiwan, Chen et al. (2010) aislaron y caracterizaron BAL de moras maduras. Los 88 aislados produjeron acidez y fueron caracterizados según su fenotipo, mediante análisis de RFLPs y secuenciamento del gen ARNr 16S. Las especies más abundantes fueron *Weissella cibaria y Lactobacillus plantarum* productoras de bacteriocinas contra una cepa indicadora de *Lactobacillus sakei.*

Ong et al. (2012) identificaron BAL procedentes de pitaya roja, una fruta originaria de México y Sudamérica a través de métodos fenotípicos y moleculares que incluyeron ARDRA, RAPD-PCR y secuenciamiento del gen ARNr 16S. Las cepas aisladas pertenecieron a *Enterococcus durans* y *E. faecalis*

Emerenini et al. (2013), investigaron la diversidad e identidad de BAL aisladas de frutas frescas y vegetales mediante PCR anidada (Nested PCR) y el secuenciamiento de los productos obtenidos. Las técnicas les permitieron

identificar diferentes especies de los géneros *Weissella, Lactobacillus* y *Leuconostoc.*

2.1.2. De la caracterización fenotípica y molecular de BAL

Tamang et al. (2008) aislaron BAL a partir de brotes de bambú y las caracterizaron tanto fenotípica como molecularmente. La caracterización fenotípica se realizó a través de pruebas fisiológicas y el sistema API. Las pruebas moleculares incluyeron RAPD-PCR, rep-PCR, secuenciamiento del gen ARNr 16S e hibridación DNA-DNA. Las cepas de BAL predominantes fueron *Lactobacillus brevis, L. plantarum* y *L. curvatus, Pediococcus pentosaceus, Leuconostoc mesenteroides* y *Enterococcus durans.*

Robert et al. (2009) investigaron la diversidad de BAL en masas fermentadas de trigo y la caracterizaron a través de técnicas fenotípicas y moleculares. La técnica de PCR con cebadores específicos permitió identificar 6 géneros y 15 especies: *L. plantarum, L. curvatus, L. paracasei, L. sanfranciscenses, L. pentosus, L. paraplantarum, L. sakei, L. brevis, Pediococcus pentosaceus, L. mesenteroides, L. citreum, Weissella cibaria, W. confusa, Lactococcus lactis* y *Enterococcus hirae.*

Gomes et al. (2010) identificaron poblaciones de BAL procedentes de cachaza, una bebida fermentada de origen brasileño, mediante métodos fisiológicos y moleculares. El análisis de restricción de los espaciadores intergénicos 16S – 23S amplificados permitió la identificación de los aislados, siendo las especies prevalentes *Lactobacillus plantarum* y *L. casei.*

Kšicová et al. (2013) realizaron la diferenciación rápida de especies de *Lactobacillus* mediante el análisis de perfiles de restricción de ADNr amplificado por PCR (ARDRA), utilizaron las enzimas de restricción *Alu*I y *Msp*I. El análisis

permitió determinar 10 perfiles, demostrando que el método tuvo una alta capacidad discriminante de los aislados.

Sagdic et al. (2014) evaluaron la diversidad y el potencial probiótico de BAL aisladas de una bebida fermentada. Los aislados fueron caracterizados molecularmente por rep-PCR (GTG_5) y Box-PCR e identificados mediante el secuenciamiento del gen ARNr 16S. Las técnicas permitieron caracterizar 332 aislados. Las especies más abundantes fueron *Lactobacillus plantarum, L. casei* y *L. brevis.*

2.2. Bases teóricas

El primer cultivo puro de bacterias lácticas fue obtenido en 1873 por J. Lister y lo denominó *Bacterium lactis*, años después se le denominó *Streptococcus lactis* y en la actualidad este microorganismo es conocido como *Lactococcus lactis*. Los cultivos iniciadores para quesos y leche agria en base a BAL fueron introducidos en la industria en 1890. La primera monografía sobre BAL fue escrita en 1919 por S. Orla Jensen. Las BAL incluyen un amplio rango de cocos y bacilos Gram positivos, no forman esporas, usualmente son catalasa negativas en ausencia de porfirinas aunque algunas especies pueden formar una pseudocatalasa, aerotolerantes, tolerantes al ácido, organotróficas y estrictamente fermentativas, cuya característica fundamental es que secretan ácido láctico como principal producto final cuando crecen en un medio que contiene glucosa. Las células de BAL son usualmente no móviles y tienen un requerimiento complejo de factores de crecimiento y vitaminas (König & Fröhlich, 2009).

2.2.1. Clasificación de las BAL

La clasificación de las BAL fue iniciada en 1919 por Orla - Jensen según pruebas de fermentación de azúcares, producción de gas, tipo de fermentación (homoláctica o heretoláctica), morfología celular, comportamiento en presencia de oxígeno (presencia de catalasa, microaerófilos o estrictamente anaerobios) y temperatura óptima de crecimiento (mesófilos o termófilos). Esta clasificación

dividió a las BAL en 7 géneros y permaneció vigente hasta el advenimiento de la bioquímica moderna y el desarrollo de las técnicas de biología molecular que surgieron a partir de la década de los 70's. A pesar del tiempo, el esquema planteado por Orla-Jensen continúa siendo valioso debido a que utiliza pruebas sencillas de uso rutinario en bacteriología (Axelsson & Ahrné, 2000; Holzapfel & Wood, 2014; König & Fröhlich, 2009; Teuber, 1993)

Actualmente, además de los atributos utilizadas por Orla - Jensen, otras características útiles para la clasificación de las BAL son: la configuración del ácido láctico producido (D ó L), hidrólisis de arginina, la habilidad para crecer a alta concentración de sal y tolerancia ácida o alcalina, tolerancia al etanol, composición de la pared celular, composición de ácidos grasos, patrones basados en técnicas de PCR, homología DNA-DNA, secuencia del gen ARNr 16S, etc. (Kun Lee & Salminem, 2009).

Las BAL han sido clasificadas según sus características fenotípicas, fisiológicas y moleculares en los Phylum: *Firmicutes* y *Actinobacteria.* Dentro del Phylum *Firmicutes*, las BAL pertenecen a la Clase *Bacilli*, Orden *Lactobacillales,* el cual comprende 6 familias, 40 géneros y más de 200 especies reportadas hasta el año 2011. Los géneros más conocidos de BAL que pertenecen a este Phylum son: *Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Streptococcus* y *Weissella; Lactobacillus* es el más grande de estos géneros. En el Phylum *Actinobacteria* solo está incluido el Género *Bifidobacterium* (Holzapfel & Wood, 2014; Sun et al., 2014).

2.2.2. Metabolismo de las BAL

Las BAL son microorganismos exigentes que poseen complejos requerimientos nutricionales como vitaminas, minerales; incluso algunas especies requieren factores de crecimiento como el jugo de tomate, suero de leche, etc. Las BAL degradan los carbohidratos a través de diferentes rutas metabólicas y generan

ATP a través de mecanismos de fosforilación oxidativa a nivel de sustrato (ya que no poseen un sistema respiratorio funcional), el cual es posteriormente usado para el transporte de solutos a través de la membrana celular y procesos de biosíntesis (Holzapfel & Wood, 2014).

Teniendo en cuenta el modo de fermentación de la glucosa, las BAL están divididas en dos grupos:

a) Homolácticas, utilizan la glicólisis o vía Embden – Meyerhoff – Parnas (EMP) para fermentar una molécula de glucosa y convertirla a dos moléculas de ácido láctico y dos moléculas de ATP por fosforilación a nivel de sustrato. La enzima clave de esta vía es la fructosa 1,6- difosfato aldolasa. Esta vía es usada por los miembros de las familias *Enterococcaceae, Lactobacillaceae* y *Streptococcaceae*, excepto por algunas especies del género *Lactobacillus* (Holzapfel & Wood, 2014).

b) Heterolácticas, carecen de la enzima aldolasa debido a ello son incapaces de realizar la glicólisis y en lugar de esta, usan la vía de la fosfocetolasa (6 – fosfogluconato) para fermentar una molécula de glucosa y convertirla a una molécula de ácido láctico, una molécula de CO_2 y una molécula de etanol/acetato. La enzima clave de esta vía es la fosfocetolasa. Debido a que el enlace CoA rico en energía se pierde durante la formación de etanol en esta vía, solo se produce la ganancia neta de una molécula de ATP por mol de glucosa consumida, es decir la mitad de energía producida por las BAL homofermentativas. La vía de la fosfocetolasa es utilizada por los miembros de la familia *Leuconostocaceae* y varias especies del género *Lactobacillus* (Holzapfel & Wood, 2014; Madigan et al., 2015)

   Las BAL también poseen la capacidad de metabolizar pentosas como la arabinosa, xilosa y ribosa; las cuales son transportadas al interior de la célula por permeasas y metabolizadas a través de la vía de la fosfocetolasa (Holzapfel & Wood, 2014; Madigan et al., 2015).

Teniendo en cuenta las vías bioquímicas utilizadas para metabolizar la glucosa y las pentosas las BAL se dividen en tres grupos:

a) Homofermentativas obligadas, fermentan la glucosa a ácido láctico exclusivamente a través de la vía de EMP, pero no pueden fermentar pentosas ni compuestos relacionados. Las cepas que cumplen estas características están clasificadas como *Lactobacillus spp.* Grupo I. (Holzapfel & Wood, 2014)

b) Heterofermentativas facultativas, fermentan la glucosa exclusivamente a ácido láctico vía la glicólisis y las pentosas y compuestos relacionados por la vía de la fosfocetolasa. En este grupo están incluidos los *Lactobacillus spp.* Grupo II y los géneros *Enterococcus, Lactococcus, Lactovum, Paralactobacillus, Pediococcus, Streptococcus, Vagococcus* (Holzapfel & Wood, 2014).

c) Obligatoriamente heterofermentativas, fermentan la glucosa, pentosas y compuestos relacionados a través de la vía de la fosfocetolasa. Están incluidos en este grupo: *Leuconostoc, Oenococcus, Weissella y Lactobacillus spp.* Grupo III (Holzapfel & Wood, 2014).

La clasificación de las BAL como homofermentativas obligadas o heterofermentativas obligadas depende, por lo tanto, de la presencia o ausencia de las enzimas aldolasa o fosfocetolasa, claves en las vías de EMP y fosfocetolasa respectivamente. Las BAL homofermentativas obligadas poseen aldolasa y carecen de fosfocetolasa, lo contrario ocurre con las BAL heterofermentativas obligadas. Las BAL heterofermentativas facultativas poseen las enzimas para ambas vías metabólicas (Holzapfel & Wood, 2014).

2.2.3. Ecología de las BAL

Las BAL habitan en ambientes ricos en nutrientes, pueden ser encontradas en alimentos (productos lácteos, frutas, carnes y pescado fermentados, comidas y salsas fermentadas, vegetales encurtidos, ensilados, jugos de frutas, cerveza, vino, bebidas fermentadas), agua, suelos, aguas residuales y en las cavidades (oral, genital, intestinal y tracto respiratorio) de humanos o animales (König & Fröhlich, 2009; Sun et al., 2014).

El género *Lactobacillus,* incluye a más de 100 especies que han sido encontradas en diversos sustratos ricos en carbohidratos, estrechamente asociadas con animales marinos y terrestres, con plantas, materiales de origen vegetal, estiércol y con alimentos lácteos. Asimismo, han sido aisladas de las cavidades de humanos y animales. Se ha descrito el aislamiento de 154 especies a partir de diferentes fuentes, casi la tercera parte ha sido aislada del tracto intestinal y las heces de humanos y animales; mientras que la segunda la constituyeron los vegetales y sus productos fermentados (Sun et al., 2014).

Las especies de *Enterococcus* y *Bifidobacterium* han sido aisladas principalmente del tracto intestinal y heces de animales o humanos (Sun et al. 2014). Respecto al género *Leuconostoc*, las especies han sido aisladas de carnes congeladas, fuentes clínicas, vegetales, productos lácteos fermentados y vinos (Thunell, 1995). En cuanto al Género *Pediococcus*, algunas especies han sido aisladas y asociadas al deterioro de la cerveza debido a la producción de diacetilo durante la fermentación (Stiles & Holzapfel, 1997). Las especies del Género *Lactococcus* han sido aisladas de vegetales y de productos lácteos (Teuber, 1993).

2.2.4. Principales géneros de BAL

Lactobacillus

Es uno de los géneros más grande y diverso involucrado en la microbiología de alimentos y en la nutrición humana debido a su rol en la producción y conservación de alimentos y propiedades probióticas. Beijerinck describió este género en 1901. Su morfología celular varía desde bacilos largos y delgados o curvos, a cocos o formas corineformes, los bacilos forman comúnmente cadenas. No móviles o excepcionalmente móviles. Son acidófilos, pueden ser homofermentativos produciendo más de 85% de ácido láctico a partir de glucosa o heterofermentativos produciendo ácido láctico, CO_2, etanol o ácido acético en cantidades equimoleculares (Sun et al., 2014). La especie tipo es *Lactobacillus delbrueckii,* otras especies muy conocidas son *L. plantarum, L. brevis, L. casei,* (König & Fröhlich, 2009; Sun et al., 2014)

Lactococcus

En 1873, Joseph Lister fue el primero en obtener y describir un cultivo puro de *Lactococcus lactis*. El género comprende cocos o células ovoides en pares o cadenas, homofermentativos, no móviles productores de ácido L-láctico como producto final predominante de la fermentación de la glucosa. La especie tipo del género es *Lactococcus lactis,* considerado el más importante microorganismo utilizado como cultivo iniciador en la industria láctea donde juega un rol importante en determinar la vida útil, preservación y calidad organoléptica de los productos fermentados (Sun et al., 2014).

Leuconostoc

Cocos o células elipsoidales heterofermentativos, se encuentran como células individuales, pares o en cadenas cortas, fermentan los azúcares por la vía del 6–fosfogluconato produciendo ácido D-láctico, etanol/acetato y CO_2. *Leuconostoc* comparte muchas características con las especies

heterofermentativas de *Lactobacillus.* Son menos tolerantes a la acidez que *Lactobacillus.* La especie tipo del género es *Leuconostoc mesenteroides* (König & Fröhlich, 2009). Importantes productores de exopolisacáridos, especialmente *Leuconostoc mesenteroides* produce dextranos, compuestos de gran importancia industrial. Juegan un rol importante en la calidad organoléptica y textura de alimentos como la leche, queso, mantequilla, carnes y vinos debido a la producción de compuestos aromáticos como el diacetilo, por ello muchas cepas son usadas como cultivos iniciadores.

Pediococcus

El nombre 'Pediococcus' fue utilizado por primera vez por Balcke en 1884 para describir cepas involucradas en el deterioro de cerveza que sólo se habían observado microscópicamente. El género *Pediococcus* abarca células esféricas, no elongadas a diferencia de *Leuconostoc* y *Oenococcus*, se encuentran en pares o formando tétradas, pero nunca en cadenas. Son homofermentativos, producen DL o L- ácido láctico. Usan un amplio rango de carbohidratos como hexosas, pentosas, disacáridos, trisacáridos y polisacáridos. Pueden poseer plásmidos que codifican la producción de bacteriocinas (pediocina) que previenen el deterioro de la carne. Son usados como cultivos iniciadores en la producción de quesos, ensilados y salsas. Juegan un rol importante en la maduración de quesos. La especie tipo del género es *Pediococcus damnosus* (König & Fröhlich, 2009).

Streptococcus

En 1994 la palabra ‘Spreptococcus’ fue usada para describir a la especie tipo *Streptococcus pyogenes.* El género está conformado por células esféricas u ovoides típicamente arregladas en pares o en cadenas. Poseen metabolismo homofermentativo. Una de las especies más conocidas del género es *Streptococcus thermophilus*, la cual es esencial para la manufactura de muchos tipos de productos lácteos fermentados (Sun et al., 2014).

Oenococcus

Han sido aislados a partir de mosto y vino. Forman células esféricas o lenticulares en pares o cadenas. Fue separado del Género *Leuconostoc* en 1995. Especie tipo: *Oenococcus oeni* (König & Fröhlich, 2009).

Weissella

Descrito por Collins et al. (1993) quienes en base al análisis de ARNr, reclasificaron a *Leuconostoc paramesenteroides* como *Weissella paramesenteroides*, y a cinco lactobacilos heterofermentativos (*L. confusus, L. halotolerans, L. kandleri, L minor* y *L. viridescens),* los cuales fueron asignados también al género *Weissella.* Son células esféricas, lenticulares o bacilos irregulares, heterofermentativos obligadas. Algunas especies del género juegan un rol importante en la fermentación de alimentos y han recibido atención por su gran potencial probiótico y la producción de dextranos. Especie tipo del género: *Weissella viridescens* (König & Fröhlich, 2009; Fusco et al., 2015).

2.2.5. Metabolitos de interés biotecnológico producidos por las BAL

Diversas investigaciones dan cuenta de la capacidad de las BAL para sintetizar metabolitos de gran interés industrial, algunos de ellos son:

Acido láctico, es el primer ácido orgánico funcionalmente versátil producido biotecnológicamente, principal producto de la fermentación de las BAL; es uno de los productos químicos más utilizados como preservante (acidulante) y saborizante en la industria alimentaria, tiene uso como emulsificante y humectante en la industria cosmética, en la síntesis de medicamentos ópticamente puros e intermediarios en las industrias farmacéutica y peletera (Papagianni, 2012). La producción de ácido láctico se puede realizar mediante síntesis química o a través de fermentación microbiana, siendo este útlimo proceso ventajoso debido a que se obtiene ácido láctico ópticamente puro (D(-) o L(+)), dependiendo de la cepa bacteriana usada, a diferencia del proceso

químico en el cual se obtiene una mezcla racémica que requiere procesos adicionales; asimismo su producción es posible con bajo consumo de energía y a partir de fuentes renovables de bajo costo. Se calcula que la demanda mundial de ácido láctico es de 714,2 kilotoneladas en el 2013 y se espera que se incremente anualmente a razón de 15.5 % hasta alcanzar 1960,1 kilotoneladas para el 2020 (Komesu et al., 2017). Actualmente, hay una creciente demanda por ácido láctico debido a su uso como monómero para la síntesis ácido poliláctico, un polímero biodegradable con propiedades semejantes a las del ptereftalato de polietileno (PET). El ácido poliláctico es un poliéster alifático lineal biodegradable, biocompatible, termoplástico y altamente resistente a la tracción. Estas características permiten utilizar el ácido poliláctico en la fabricación de envases, en la fabricación de dispositivos médicos (matrices para la regeneración de tejidos, sistemas de transporte de medicamentos, hilos para sutura quirúrgica, stents), etc.(Mazzoli et al., 2014; Madhavan et al., 2010).

Polihidroxialcanoatos (PHAs, PHBs), son poliésteres naturales, lineales, biodegradables que son producidos como compuestos intracelulares de almacenamiento por un gran número de bacterias incluyendo las BAL, levaduras y plantas. Tienen aplicaciones biomédicas para la fabricación de dispositivos cardiovasculares (stents, válvulas), dispositivos ortopédicos y de transporte de medicamentos (implantes, microcarriers) (Lu, Tappel, & Nomura, 2009).

Exopolisacáridos (EPS), de gran aplicación en la industria alimentaria debido a que mejoran las propiedades reológicas, suavidad, cremosidad, textura, estabilidad y retención de la capacidad de agua de los productos lácteos (quesos, yogurt, helados), reemplazando a otros estabilizantes como la pectina, almidón, alginatos o gelatina. Asimismo, los EPS tienen propiedades prebióticas y posibles actividades antitumorales, antiulcerosas, inmunomodulatorias, reductoras de colesterol (Papagianni, 2012, De Vuyst et al., 2011). Los EPS son polisacáridos de largas cadenas a veces ramificadass

conformadas por unidades repetitivas de azúcares o derivados de azúcares como glucosa, galactosa, manosa, N-acetil glucosamina, N-acetilgalactosamina y ramnosa en proporciones variables, son secretados al medio durante el crecimiento bacteriano jugando un rol importante en la protección frente a condiciones ambientales adversas como la desecación, falta de nutrientes, presencia de compuestos tóxicos, estrés osmótico, etc. Los EPS pueden ser clasificados de acuerdo a su composición química como homopolisacáridos y heteropolisacáridos. Los homopolisacáridos están compuestos por monosacáridos idénticos, D-glucosa o D-fructosa y a su vez pueden ser divididos en glucanos y fructanos, uno de los homopolisacáridos más conocidos es el dextrano. Por su parte, los heteropolisacáridos tienen entre 3 a 8 unidades repetitivas de dos o más monosacáridos, un ejemplo es el xantano. La contribución al mercado de los EPS producidos por BAL es pequeña debido a procesos de producción ineficientes que generan rendimientos reducidos y altos costos de producción, se requiere por lo tanto profundizar en la investigación para conocer con más detalle los mecanismos de biosíntesis, genes involucrados en el proceso e incluso aplicar la ingeniería genética para la mejora de las BAL involucradas (Patel et al., 2012).

Nutracéuticos, las BAL sintetizan moléculas con reconocidas propiedades promotoras de la salud como el ácido γ- aminobutírico (GABA), β-feniletilamina, péptidos bioactivos, ácidos grasos de cadena corta, ácidos linoleicos conjugados y vitaminas (Pessione, 2012)**,** que han sido propuestas como aditivos para la manufactura de alimentos funcionales. El GABA es uno de los mayores neurotransmisores del sistema nervioso central de vertebrados, asimismo, actúa como modulador de la presión arterial en pacientes hipertensivos teniendo efectos diuréticos y tranquilizantes. Adicionalmente el GABA juega un rol regulador en el páncreas y en procesos inmunológicos como la liberación de citoquinas proinflamatorias (Mazzoli et al., 2014).

Bacteriocinas, compuestos proteináceos (péptidos o pequeñas proteínas) que poseen la propiedad de interferir con el crecimiento de otras bacterias, tienen

acción bactericida. Estos compuestos tienen aplicación tanto en la industria de alimentos para impedir el desarrollo de microorganismos patógenos o responsables del deterioro de los alimentos (Cotter et al., 2005) o como sustitutos de antibióticos para el tratamiento de infecciones en humanos y animales (Cotter et al., 2013; Valdéz et al., 2005).

Edulcorantes, azúcares o polioles, catalogados como edulcorantes con bajo contenido calórico, considerados compuestos GRAS por la FDA, además de sus propiedades tecnológicas (reemplazantes del azúcar, humectantes, suavizantes, estabilizantes del color, texturizantes, crioprotectores) (Monedero et al., 2010; Ortiz et al., 2013), ejercen beneficios para la salud como hipoglicemiantes, anticariocigénicos, diuréticos, prebióticos. Por ser polioles no se absorben o son parcialmente absorbidos en el intestino delgado, alcanzan el colon donde son degradados por bacterias generando diversos ácidos grasos de cadena corta a los cuales se les atribuye efectos benéficos para los consumidores (Liong & Shah, 2005; Monedero et al., 2010). Algunos edulcorantes producidos por las BAL incluyen: manitol, sorbitol, tagatosa, trehalosa; los cuales pueden ser aprovechados como ingredientes para el desarrollo de comidas bajas en calorías orientadas a niños, pacientes diabéticos o personas con sobrepeso (Patra et al., 2009).

En adición a los metabolitos ya mencionados, otros compuestos de gran interés producidos por las BAL son los biocombustibles (formato, etanol), compuestos aromáticos (diacetilo, adetaldehído) y vitaminas (ácido fólico, riboflavina) que actualmente son motivo de diversas investigaciones con el uso de la ingeniería metabólica para mejorar la capacidad natural de producción de estos importantes metabolitos (Mazzoli et al., 2014; Papagianni, 2012).

2.2.6. Métodos para la identificación y caracterización de BAL

2.2.6.1. Métodos fenotípicos

Tradicionalmente, la morfología celular ha sido el criterio principal para la clasificación de las BAL, así pueden por ejemplo distinguirse lactobacilos de estreptococos. Sin embargo, en algunos casos como el de *Weissella*, este género abarca cepas consideradas previamente como *Leuconostoc* (cocos) o *Lactobacillus* (bacilos) (Axelsson & Ahrné, 2000). Por lo tanto, aun cuando la morfología es un carácter importante, no es determinante para la identificación de las BAL.

Las pruebas fisiológicas como el crecimiento a diferentes temperaturas, a diferentes condiciones de acidez o salinidad, producción de gas, etc., son útiles pero difícilmente pueden ser usados para la identificación de los distintos géneros de BAL (Axelsson & Ahrné, 2000). Por ejemplo, la generación de gas a partir de glucosa permite distinguir entre grupos homofermentativos y heterofermentaivos, pero dentro del Género *Lactobacillus,* existen especies de ambos grupos.

Los patrones de fermentación de carbohidratos son usados para la diferenciación de especies, sin embargo tienen limitaciones debido al alto grado de variabilidad dentro de las especies, variaciones interlaboratorios, baja reproducibilidad y variaciones en los resultados dependiendo del método utilizado (Pot et al., 1994; Axelsson & Lindgren, 1987).

Si bien es cierto, los métodos fenotípicos nos ofrecen valiosa información sobre la morfología, las propiedades fisiológicas y metabólicas de los microorganismos, por sí solos no permiten realizar

su identificación y son los métodos moleculares los más certeros para este fin.

2.2.6.2. Métodos moleculares

La mayor ventaja de estos métodos frente a los métodos fenotípicos, es su gran poder para discriminar microorganismos estrechamente relacionados, incluso a nivel de cepas, y su aplicación universal. Los métodos más conocidos son:

Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE, TGGE)

Dos técnicas en las cuales se lleva a cabo la electroforesis de fragmentos pequeños de ADN (200-700 pb) amplificados mediante PCR, en geles de poliacrilamida aplicando un gradiente desnaturalizante. En la técnica de DGGE se utilizan compuestos químicos como urea o formamida, mientras en que la TGGE se emplea un gradiente de temperatura permitiendo que los fragmentos de ADN se separen de acuerdo a su temperatura de fusión lo cual depende de la longitud de los fragmentos, del contenido de GC y de la secuencia nucleotídica. Ambos métodos son ideales para la identificación y el monitoreo de la diversidad microbiana (Liu et al., 2012; Stefanis et al., 2016; Giusto et al., 2007).

Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE)

La técnica permite el fraccionamiento de grandes fragmentos de ADN (0,1 a 100 Mb) derivados de la digestión con enzimas de restricción mediante electroforesis en geles de agarosa utilizando campos eléctricos que se alternan (“pulsan”) en dos direcciones (Nassonova, 2008) dando como resultado perfiles de bandas característicos que pueden ser usados en la caracterización bacteriana. Los perfiles obtenidos representan todo el genoma y por

lo tanto la técnica tiene un gran poder discriminante. La PGFE ha sido usada satisfactoriamente en la diferenciación de cepas probióticas de BAL de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Stefanis et al., 2016).

Análisis de los genes ribosómicos 16S / 23S

El ribosoma bacteriano está compuesto por dos subunidades 30S y 50S, la subunidad 30S contiene la molécula de ARNr 16S y la subunidad 50S contiene ARNr 5S y 23S. Los fragmentos 5S, 16S y 23S se han empleado en estudios filogenéticos, siendo el 16S el más adecuado en el estudio de procariotas con cerca de 1550 pares de bases. Los genes ARNr 16S y 23S contienen secuencias conservadas, variables e hipervariables (Rodicio & Mendoza, 2004).

Actualmente, la secuenciación de los genes ribosómicos 16S es la herramienta más poderosa y fiable en los estudios de relaciones filogenéticas entre bacterias. Esta molécula, considerada un marcador, contiene regiones altamente conservadas y presencia universal (Mohania et al., 2008; Rodicio & Mendoza, 2004). Esta técnica consiste en amplificar los genes por PCR usando iniciadores universales de regiones conservadas a ambos lados del gen. Una vez obtenida la secuencia, puede ser alineada, comparada con las secuencias almacenadas en bases de datos y calculada su similitud (Rodicio & Mendoza, 2004). Muchas especies de las BAL han sido identificadas a través de esta técnica.

Técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

a) ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD)

Es un método simple, rápido y económico para la tipificación de cepas de BAL. Hace uso de cebadores arbitrarios que son capaces de unirse, bajo condiciones poco exigentes, a secuencias parcial o totalmente complementarias de localización desconocida en el genoma de un organismo, dando como resultado la amplificación de fragmentos de ADN de distinto tamaño que producen patrones característicos de cada cepa en un gel de agarosa. Es una herramienta que detecta variabilidad a lo largo de todo el genoma bacteriano, es fiable para la identificación, tipificación de las BAL de productos alimenticios y cepas del género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. El poder discriminativo aumenta cuando es combinado con otras técnicas o se emplean diferentes iniciadores. (Amorocho, 2011; Ben Amor et al., 2007; Stefanis et al., 2016).

b) Polimorfismos en longitud de los fragmentos de restricción de los productos amplificados (RFLP-PCR)

Mediante PCR se amplifica una secuencia conocida del ADN genómico utilizando dos cebadores complementarios a sus regiones extremas, seguido de una digestión con una endonucleasa de restricción y posterior comparación de los distintos patrones de bandas de restricción obtenidos. La metodología de análisis resulta ser complicada y proporciona información restringida porque se analiza una parte del genoma (Collado, 2004).

c) Análisis de polimorfismos en longitud de los fragmentos amplificados (AFLPs):

La técnica está basada en la detección de polimorfismos generados por la presencia o ausencia de fragmentos de restricción obtenidos a través de la digestión del ADN y posteriormente amplificados por PCR. Mediante esta técnica el ADN genómico total es digerido usando 2 enzimas de restricción con diferente frecuencia de corte, los fragmentos resultantes son ligados a nucleótidos (adaptadores) que sirven como sitios de reconocimiento y unión de cebadores para la posterior amplificación por PCR. El uso de cebadores complementarios a los adaptadores y los sitios de restricción producen patrones de amplificación característicos de cada cepa. La técnica se ha aplicado satisfactoriamente para la tipificación de cepas del grupo *Lactobacillus acidophilus* y *L. johnsonii* (Ben Amor et al., 2007).

Además de las técnicas mencionadas, existen otras como ARDRA (Análisis de amplificados de fragmentos de restricción de ADN ribosómico), rep-PCR (PCR de secuencias extragénicas repetitivas palindrómicas) que poseen un alto poder discriminatorio para la diferenciación de BAL y constituyen valiosas herramientas cuando se usan en combinación con otras técnicas de tipificación (Ben Amor et al., 2007).

Ribotipificación

La técnica se basa en el uso de sondas de ácidos nucleicos para reconocer genes ribosómicos (Mohania et al., 2008). Es una variante del análisis de RFLP, donde ciertos fragmentos de ADN son detectados mediante sondas específicas, con el fin de obtener

patrones menos complejos y que son más fáciles de interpretar. Los patrones generados consisten en fragmentos de ADN cromosómicos derivados del operón del ARNr y de sus regiones adyacentes hibridadas con sondas orientadas a secuencias parciales de los genes ribosómicos o a las regiones intergénicas espaciadoras de todo el operón *rrn*. Esta técnica posee gran poder discriminatorio al nivel de especies y subespecies y ha sido utilizada para caracterizar cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Ben Amor et al., 2007; Stefanis et al., 2016)

CAPITULO III. METODOLOGÍA

3.1. Recolección de muestras

Los frutos fueron recolectados en el Mercado Belén de la ciudad de Iquitos en Julio del 2016 (Tabla 1). Se colectaron entre 3 a 4 muestras por cada fruto, se colocaron en bolsas estériles y se transportaron en frío hacia la ciudad de Lima para su estudio en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Tabla 1. Lista de frutos usados en el presente estudio

N°	Nombre científico	Nombre común
1	*Anacardiun occidentale*	casho
2	*Passiflora nítida*	granadilla
3	*Citrus paradisi*	toronja
4	*Solanum sessiliflorum*	cocona
5	*Poraqueiba serícea*	umarí
6	*Passiflora edulis*	maracuyá
7	*Oenocarpus bataua*	ungurahui
8	*Mauritia flexuosa*	aguaje
9	*Mauritiella aculeata*	aguajillo
10	*Averroa carambola*	carambola
11	*Psidium guajava*	guayaba
12	*Myrciaria dubia*	camu camu
13	*Genipa americana*	huito
14	*Bactris gasipaes*	pijuayo

3.2. Aislamiento de BAL

3.2.1. Pre-enriquecimiento

Se realizó un hisopado de la superficie de los frutos utilizando torundas estériles humedecidas con solución salina fisiológica (NaCl 0,85 %). Los hisopos fueron colocados en tubos conteniendo caldo Man Rogosa Sharpe (MRS) (Merck, Darmstadt, Germany). La incubación se realizó en anaerobiosis usando el reactivo Anaerocult® A (Merck, Darmstadt, Germany) a 30 °C por 48 h.

3.2.2. Aislamiento primario

Se sembraron 100 µL de las muestras pre-enriquecidas en agar MRS. Las placas fueron incubadas en anaerobiosis usando reactivo Anaerocult® A (Merck, Darmstadt, Germany) a 30 °C por 48 h.

3.2.3. Aislamiento en cultivo puro

De cada placa se aislaron 5 colonias por fruto considerando las características macroscópicas de forma, color, tamaño y apariencia de las mismas. La siembra se realizó en agar MRS incubando las placas en anaerobiosis usando reactivo Anaerocult® A (Merck, Darmstadt, Germany) a 30 °C por 48 h. Se realizó coloración Gram a cada uno de los aislados para verificar su pureza. Este procedimiento se repitió tres veces a fin de estabilizar el cultivo.

3.3. Identificación preliminar de BAL

Los cultivos puros fueron evaluadas mediante tres pruebas: coloración Gram, prueba de catalasa y producción de acidez. La coloración Gram, se realizó a partir de cultivos de 48 h siguiendo los pasos convencionales conocidos para esta tinción.

La prueba de catalasa se realizó colocando en una lámina portaobjetos una gota de solución de peróxido de hidrógeno al 3 % y una asada del cultivo a evaluar. La formación de burbujas evidenció una reacción positiva.

La prueba de producción de acidez se realizó sembrando los aislados en agar MRS suplementado con 1 % de $CaCO_3$. Los cultivos fueron incubados en anaerobiosis durante 48 h a 30 °C. El medio adquirió una apariencia lechosa. La presencia de un halo translúcido alrededor de la zona de crecimiento bacteriano evidenció la producción de acidez.

3.4. Selección de BAL

Se seleccionaron los aislados Gram positivos, catalasa negativos y productores de acidez. Los aislados seleccionados fueron conservados en glicerol al 50 % a – 20 °C.

3.5. Caracterización fenotípica de BAL

3.5.1. Observación macroscópica y microscópica

Las BAL seleccionadas se sembraron en agar MRS y se incubaron a 30 °C por 48 h en anaerobiosis con la finalidad de obtener colonias aisladas. A simple vista se determinaron las características macroscópicas: tamaño, color, forma y apariencia de las colonias. Las características microscópicas fueron evaluadas realizando tinción Gram de cultivos de 48 h y observándolos al microscopio con aumento de 1000 X.

3.5.2. Pruebas nutricionales

a) Fermentación de carbohidratos

Las BAL se sembraron en tubos conteniendo caldo rojo de fenol suplementado con 1 % del carbohidrato a evaluar. Los carbohidratos evaluados fueron: glucosa, fructosa, galactosa, maltosa, lactosa, celobiosa y sacarosa. La incubación se realizó a 30 °C por 48 h en anaerobiosis. La prueba fue positiva cuando se observó cambio de color del caldo de rojo al amarillo.

b) Producción de CO_2 a partir de glucosa

Las BAL se sembraron en tubos conteniendo caldo MRS y campana de Durham. Se incubaron en anaerobiosis a 30 °C por 48 h. La presencia de burbujas en la campana de Durham al final del periodo de incubación indicó producción de CO_2.

3.5.3. Pruebas fisiológicas

Se evaluó el crecimiento de las BAL a diferentes condiciones de pH, temperatura y concentración de sal.

a) Crecimiento a diferentes valores de pH

Las BAL se sembraron en tubos conteniendo caldo MRS cuyo pH fue ajustado a 3,5 y 7,5 utilizando HCl 0,5 N ó NaCl 0,5 N respectivamente. La incubación se realizó en anaerobiosis a 30 °C por 48 h. La evaluación del crecimiento se realizó mediante espectrofotometría a 620 nm.

b) Crecimiento a diferentes valores de temperatura

Las BAL se sembraron en tubos conteniendo caldo MRS. La incubación se realizó de manera independiente a 10 °C y 45 °C en anaerobiosis por 48 h. La evaluación del crecimiento se realizó mediante espectrofotometría a 620 nm.

c) Crecimiento a diferentes concentraciones de sal

Las BAL se sembraron en tubos conteniendo caldo MRS suplementado con NaCl a 5,0; 10,0 y 12,5 % respectivamente, después se incubaron en anaerobiosis a 30 °C por 48 h. La evaluación del crecimiento se realizó mediante espectrofotometría a 620 nm.

3.5.4. Actividad hidrolítica

a) Hidrólisis de proteínas

Las BAL se sembraron en placas con agar MRS suplementado con leche descremada 1 % (Jini et al., 2011). Las placas fueron incubadas en anaerobiosis a 30 °C por 48 h. La presencia de halos de hidrólisis alrededor de la zona de crecimiento bacteriano indicó una prueba positiva.

b) Hidrólisis de almidón

Las BAL se sembraron en placas con agar MRS modificado reemplazando la glucosa del medio MRS original por almidón 1 % (Díaz-Ruiz et al., 2003). Las placas fueron incubadas en anaerobiosis a 30 °C por 48 h. La presencia de halos de hidrólisis alrededor de las zonas de crecimiento después de añadir una solución de lugol indicó una reacción positiva.

3.5.5. Prueba de sensibilidad antimicrobiana

Los antibióticos fueron escogidos siguiendo los criterios recomendados por la European Food Safety Authority (2012) y la disponibilidad de los mismos en el laboratorio. Se evaluó la sensibilidad antimicrobiana de las BAL a: amoxicilina (10 µg), bacitracina (10 U), cloranfenicol (30 µg), eritromicina (15 µg), novobiocina (30 µg), penicilina G (10 µg), rifampicina (30 µg), sulfametoxazol-trimetoprim (25 µg) y vancomicina (30 µg) (Oxoid). Se utilizó el método de Kirby-Bauer o difusión en placa modificado, para lo cual se prepararon suspensiones de los aislados a evaluar y se sembraron en la superficie de placas conteniendo agar MRS usando hisopos estériles. Después de 5 min se colocaron asépticamente los discos de antimicrobianos a evaluar. Las placas fueron incubadas en anaerobiosis a 30 °C por 24 h. Finalmente, el diámetro de las zonas de inhibición del crecimiento se evaluó según el criterio de Charteris et al. (1998) a excepción de novobiocina para la cual se empleó el criterio de Vlková et al. (2006).

3.6. Caracterización molecular de BAL

3.6.1. Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN genómico se realizó según el método de Dubernet et al. (2002) modificado. Para ello se prepararon suspensiones de cada uno de los aislados en 1 mL de agua MiliQ estéril y se centrifugaron a 10000 rpm por 5 min. El sobrenadante fue descartado y al pellet bacteriano se le adicionó TE 570 µL, SDS al 10 % 30 µL y proteinasa K (10 mg/mL) 6 µL. Después se incubó a 37 °C por 1 h. Luego los restos celulares se precipitaron con NaCl 5 M 100 µL y CTAB/NaCl (10% CTAB en NaCl 0,7 M) 80 µL, las muestras se incubaron a 65 °C por 10 min y – 20 °C por 10 min. La extracción de ADN se realizó añadiendo una mezcla de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1 v/v) 700 µL y centrifugando a 10000 rpm por 10 min a 4 °C. La fase superior se trasvasó a nuevos tubos y se repitió este paso. La precipitación de ADN se realizó añadiendo isopropanol 500 µL y centrifugando a 10000 rpm por 10 min a 4 °C. El ADN extraído fue lavado con etanol al 70 % (v/v) 350 µL. Se centrifugó a 10000 rpm por 10 min a 4 °C. El precipitado se secó a 42 °C por 20 a 30 min. Finalmente el ADN fue resuspendido en TE 50 µL y conservado a – 20 °C.

3.6.2. Análisis de perfiles de restricción de ADNr amplificado por PCR (ARDRA)

3.6.2.1. Amplificación de ADNr 16S

La amplificación de los genes ribosómicos 16S se realizó mediante PCR. El volumen de reacción fue de 25 µL y contenía: dNTPs 200 µM, cebadores 1 µM, Tris-HCl pH 8,4 20 mM, $MgCl_2$ 2 mM de, *Taq* polimerasa 2 U (Thermo Scientific) y ADN 50 ηg. (Rodas, Ferrer, & Pardo, 2003). La PCR se realizó utilizando un Termociclador Perkin Elmer 2400, Norwalk, USA.

Los cebadores utilizados fueron PA y PH, reportados por Edwards et al., (1989), cuyas secuencias son:

PH 5´-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA- 3´
PA 5´-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG- 3´

El programa de PCR consistió en un ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min seguido de 35 ciclos de amplificación que comprendieron: un paso de desnaturalización a 94 °C por 30 s, hibridación a 56 °C por 30 s y extensión a 72 °C por 1 min. La reacción fue finalizada con un paso de extensión final a 72 °C por 5 min.

Los productos amplificados se separaron por electroforesis en gel de agarosa 1,0 % (p/v) utilizando buffer TBE 1X y como marcador de peso molecular se utilizó GeneRuler 100 pb plus DNA Ladder (Thermo Scientific, Massachusetts, USA).

La visualización de los productos amplificados se realizó coloreando los geles de agarosa con una solución de bromuro de etidio 10 µg/mL y se observaron utilizando un transiluminador UV (UVP Ultra-Violet Products)

3.6.2.2. Digestión de genes ribosómicos 16S amplificados

Los ADNr amplificados fueron digeridos independientemente con 10 U de *Alu*I (Thermo Scientific, Massachusetts, USA), *Mse*I (BioLabs, Massachusetts, USA) y *Hae*III (Thermo Scientific, Massachusetts, USA). Las condiciones de incubación para cada enzima fueron las especificadas por el fabricante.

Los productos de digestión se separaron por electroforesis en gel de agarosa 2,5 % utilizando buffer TBE 1X y para estimar los pesos moleculares de los productos de digestión se utilizó el marcador GeneRuler 100 pb plus DNA Ladder (Thermo Scientific,

Massachusetts, USA). La visualización de los productos amplificados se realizó según lo descrito en el ítem 3.6.2.1.

3.6.3. Análisis de restricción de los espaciadores intergénicos 16S – 23S (RISA)

3.6.3.1. Amplificación de la región ITS 16S-23S

La amplificación de la región ITS 16S-23S se realizó mediante PCR. El volumen de reacción fue de 25,0 µL y contenía: KCl 50 mM, Tris / HCl 10 mM, tritón X-100 0,1% (v/v), $MgCl_2$ 1,5 mM, dNTP 200 µM, cebadores 20 pM, Taq ADN - polimerasa 1,5 U/µL (Thermo Scientific) y ADN 50 ηg. La PCR se realizó utilizando un Termociclador Perkin Elmer 2400, Norwalk, USA.

Los cebadores utilizados fueron 16S14F y 23S1R cuyas secuencias son:

16S14F 5’ CTTGTACACACCGCCCGTC3’

23S1R 5’ GGGTTTCCCCATTCGGAAATCA 3’.

El programa de PCR consistió en un ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C por 4 min a seguido por 35 ciclos de amplificación que comprendieron un paso de desnaturalización a 94 °C por 45 s, hibridación a 55 °C por 1 min y extensión a 72 °C por 45 s. La reacción fue finalizada con un paso de extensión final a 72 °C por 7 min.

Los productos amplificados se separaron por electroforesis en gel de agarosa 2,5 % (p/v) utilizando buffer TBE 1X y como marcador de peso molecular se utilizó GeneRuler 100 pb plus DNA Ladder (Thermo Scientific, Massachusetts, USA).

La visualización de los productos amplificados se realizó según lo descrito en el ítem 3.6.2.1.

3.6.3.2. Digestión de los ITS 16S-23S amplificados

La digestión se realizó de manera secuencial (doble digestión) utilizando dos enzimas de restricción: *Hae*III y *Taq*I (Thermo Scientific, Massachusetts, USA). Inicialmente, se realizó la digestión con *Hae*III incubando las muestras a 37 °C por 16 h, concluido este tiempo se añadió *Taq*I continuando la incubación a 65 °C por 6 h. Las condiciones de reacción fueron las recomendadas por el fabricante.

Los productos de digestión se separaron por electroforesis en gel de agarosa 2,5 % utilizando buffer TBE 1X y para estimar los pesos moleculares de los productos de digestión se utilizó el marcador GeneRuler 100 pb plus DNA Ladder (Thermo Scientific, Massachusetts, USA). La visualización de los productos amplificados se realizó según lo descrito en el ítem 3.6.2.1.

3.6.4. Amplificación de secuencias genómicas repetidas (rep-PCR)

La amplificación de secuencias genómicas repetidas (rep-PCR) se realizó mediante PCR. El volumen de reacción fue de 25 µL y contenía: dNTPs 1,25 mM, cebadores 50 pM, *Taq* polimerasa 2 U (Thermo Scientific) y ADN 100 ηg en buffer Tris-HCl pH 8.8 con DMSO 10 % (Versalovic, Schneider, Bruijn, & Lupski, 1994). La PCR se realizó utilizando un Termociclador Perkin Elmer 2400, Norwalk, USA.

El cebador utilizado fue $(GTG)_5$, reportado por Gevers et al. (2001) cuya secuencia es:

5´-GTG GTG GTG GTG GTG-3´

El programa de PCR consistió en un ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min seguido por 30 ciclos de amplificación que comprendieron un paso de desnaturalización a 94 °C por 1 min, hibridación a 40 °C por 1 min y

extensión a 65 °C por 8 min. La reacción fue finalizada con un paso de extensión final a 65 °C por 16 min.

Los productos amplificados fueron separados por electroforesis en gel de agarosa 1 % (p/v) utilizando buffer TBE 1X y como marcador de peso molecular se utilizó el Marcador ADN Lambda/*Eco*RI+*Hind*III (Thermo Scientific, Massachusetts, USA). La visualización de los productos amplificados se realizó según lo descrito en el ítem 3.6.2.1.

3.6.5. Secuenciamiento de los genes ribosómicos 16S e identificación de las BAL aisladas

Los genes ARNr 16S amplificados mediante PCR descrita en el ítem 3.6.2.1, fueron secuenciados en el Laboratorio de Epidemiología Molecular de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Las secuencias nucleotídicas obtenidas fueron procesadas utilizando los programas bioinformáticos Sequencher 4.1.4 y Nucleotide BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov) para su comparación con las secuencias depositadas en la base de datos del GenBank. La identificación fue considerada correcta cuando el porcentaje de similitud fue mayor a 99 %.

Las secuencias nucleótidicas de ARNr 16S también fueron utilizadas para construir un árbol filogenético usando el programa Mega version 7.0 (Biodesign Institute, Tempe, AZ, USA) mediante el método de Neighbor-joining y boostrap 1000.

3.6.6. Amplificación del gen *rec*A para la diferenciación de *Lactobacillus plantarum, L. pentosus y L. paraplantarum*.

La amplificación del gen *rec*A se realizó mediante PCR múltiple. Los cebadores utilizados fueron los reportados por Torriani et al. (2001) cuyas secuencias son:

planF 5´ CCG TTT ATG CGG AAC ACC TA 3´

paraF 5´ GTC ACA GGC ATT ACG AAA AC 3´
pentF 5´ CAG TGG CGC GGT TGA TAT C 3´
pREV 5´ TCG GGA TTA CCA AAC ATC AC 3´

El volumen de reacción fue de 25 µL y contenía: $MgCl_2$ 1,5 mM, cebadores paraF, pentF y pREV 0,25 µM, cebador planF 0,12 µM, dNTPs 12 µM (3 µM de cada uno), *Taq* polimerasa (Thermo Scientific) 1 U y ADN 5 ηg. La PCR se realizó utilizando un Termociclador Perkin Elmer 2400, Norwalk, USA.

El programa de PCR consistió en un ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C por 3 min seguido por 30 ciclos de amplificación que comprendieron un paso de desnaturalización de a 94 °C 30 s, hibridación a 56 °C por 10 s y extensión a 72 °C por 30 s. La reacción se completó con un paso de extensión final a 72 °C por 5 min.

Los productos amplificados fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 2.5 % (p/v) utilizando buffer TBE 1X y como marcador de peso molecular se utilizó GeneRuler 100 pb plus DNA Ladder (Thermo Scientific, Massachusetts, USA). La visualización de los productos amplificados se realizó según lo descrito en el ítem 3.6.2.1.

3.7. Potencial biotecnológico de las BAL

3.7.1. Producción de exopolisacáridos

Las BAL se sembraron en placas conteniendo agar MRS suplementado con 2 % de carbohidrato. Los carbohidratos evaluados fueron: glucosa, maltosa, fructosa y sacarosa. La incubación se realizó en anaerobiosis a 30 °C por 5 días (Fhoula et al., 2013).

La producción de exopolisacáridos se evidenció de manera cualitativa por el crecimiento de colonias con apariencia mucosa. Para confirmar la producción

de exopolisacáridos se realizó la precipitación del EPS en tubos conteniendo 2 mL de etanol frío.

3.7.2. Producción de ácido láctico

Los aislados de BAL se sembraron en caldo MRS e incubaron en anaerobiosis a 30 °C por 48 h. Los cultivos fueron centrifugados y los sobrenadantes fueron titulados con una solución de NaOH 0,5 N usando fenolftaleína al 1 % como indicador (Wakil & Ajayi, 2013). La acidez producida en el medio se expresó como ácido láctico mediante la siguiente fórmula:

$$\boldsymbol{Ac.Lact.}\,(\boldsymbol{g/L}) = \frac{Gasto\ NaOH\ (mL) * N\ NaOH * 90}{V\ muestra\ (mL)}$$

En el caso de cepas homofermentativas, se calculó el rendimiento de ácido láctico ($Y_{P/S}$) mediante la siguiente fórmula:

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{-\Delta S}\ x\ 100 = \frac{P_f - P_i}{S_i - S_f}\ x\ 100$$

Donde:

P_i : Producto inicial (g/L)

P_f : Producto final (g/L)

S_i: Sustrato inicial (g/L) = 20 g/L glucosa

S_f: Sustrato final (g/L)

Asumiendo que $P_i = 0$ y que a las 48 h (tiempo de incubación) todo el sustrato fue consumido por las BAL, entonces $S_f = 0$ y la fórmula queda reducida a:

$$Y_{P/S} = \frac{P_f}{S_i}\ x\ 100$$

CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados

4.1.1. Aislamiento y selección de BAL

A partir de los 14 frutos procedentes de la ciudad de Iquitos se obtuvieron 70 aislados, de los cuales se seleccionaron 39 que cumplieron con los tres criterios característicos de las BAL: bacterias Gram positivas, catalasa negativas y productoras de acidez (Figuras 1 y 2).

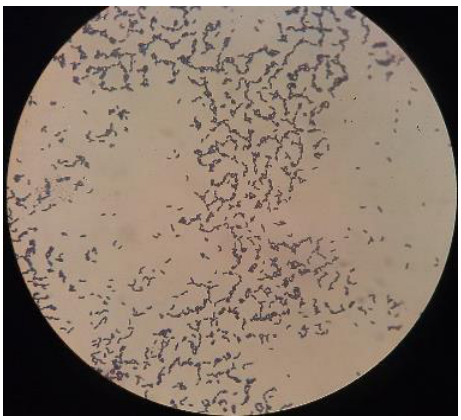


Figura 1. Observación microscópica: Bacilos Gram positivos (1000 X)

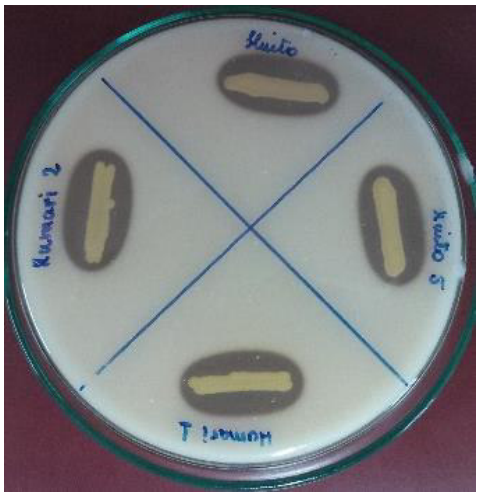


Figura 2. BAL productoras de acidez sobre agar MRS + $CaCO_3$

Respecto a las características macroscópicas, en todos los aislados se observaron colonias de diámetro pequeño, menor a 2 mm, lisas, de superficie plana a convexa, de bordes enteros y regulares, de aspecto cremoso, sin pigmentación o en algunos casos con un color ligeramente crema (Figura 3). En cuanto a las características microscópicas, se observaron células de forma cocoide y bacilar, siendo predominante la morfología bacilar.

Figura 3. Cultivos de BAL en agar MRS

En la Tabla 2 se muestran los resultados de las pruebas fisiológicas, nutricionales y de actividad hidrolítica de las 39 BAL seleccionadas.

Tabla 2. Características fenotípicas de BAL aisladas de frutos procedentes de la Región Loreto (cont.)

PRUEBAS	AISLADOS									
	BAL1	**BAL2**	**BAL3**	**BAL4**	**BAL5**	**BAL6**	**BAL7**	**BAL8**	**BAL9**	**BAL10**
Procedencia	Casho	Granadilla	Toronja	Cocona	Umari	Maracuyá	Ungurahui	Ungurahui	Ungurahui	Casho
Morfología	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Cocoide
Producción CO_2 a partir de glucosa	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Fermentación										
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fructosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactosa	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
Sacarosa	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
Maltosa	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Lactosa	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Celobiosa	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Crecimiento										
NaCl 5,0 %	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 10,0 %	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
NaCl 12,5 %	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
45 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 3,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 7,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hidrólisis										
Caseína	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Almidón	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(+) Prueba positiva, (-) Prueba negativa

Tabla 2. Características fenotípicas de BAL aisladas de frutos procedentes de la Región Loreto (cont.)

PRUEBAS	AISLADOS									
	BAL11	**BAL12**	**BAL13**	**BAL14**	**BAL15**	**BAL16**	**BAL17**	**BAL18**	**BAL19**	**BAL20**
Procedencia	Guayaba	Guayaba	Guayaba	Pijuayo	Aguajillo	Aguajillo	Aguajillo	Granadilla	Granadilla	Granadilla
Morfología	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo
Producción CO_2 a partir de glucosa	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Fermentación										
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fructosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactosa	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
Sacarosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactosa	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
Celobiosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento										
NaCl 5,0 %	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 10,0 %	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
NaCl 12,5 %	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
45 °C	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
pH 3,5	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 7,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hidrólisis										
Caseína	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Almidón	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(+) Prueba positiva, (-) Prueba negativa

Tabla 2. Características fenotípicas de BAL aisladas de frutos procedentes de la Región Loreto (cont.)

PRUEBAS	AISLADOS									
	BAL21	**BAL22**	**BAL23**	**BAL24**	**BAL25**	**BAL26**	**BAL27**	**BAL28**	**BAL29**	**BAL30**
Procedencia	Granadilla	Guayaba	Guayaba	Huito	Huito	Huito	Huito	Huito	Umari	Maracuyá
Morfología	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo
Producción CO_2 a partir de glucosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentación										
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fructosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactosa	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactosa	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Celobiosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento										
NaCl 5,0 %	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 10,0 %	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
NaCl 12,5 %	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
45 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 3,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 7,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hidrólisis										
Caseína	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Almidón	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(+) Prueba positiva, (-) Prueba negativa

Tabla 2. Características fenotípicas de BAL aisladas de frutos procedentes de la Región Loreto

PRUEBAS	AISLADOS								
	BAL31	BAL32	BAL33	BAL34	BAL35	BAL36	BAL37	BAL38	BAL39
Procedencia	Maracuyá	Maracuyá	Pijuayo	Pijuayo	Pijuayo	Pijuayo	Toronja	Ungurahui	Ungurahui
Morfología	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Cocoide	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo
Producción CO_2 a partir de glucosa	-	-	+	-	-	-	-	+	+
Fermentación									
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fructosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactosa	+	+	-	+	+	+	+	-	-
Sacarosa	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Maltosa	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Lactosa	+	+	-	+	+	+	+	-	-
Celobiosa	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Crecimiento									
NaCl 5,0 %	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 10,0 %	+	+	-	+	+	+	+	-	-
NaCl 12,5 %	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
45 °C	+	+	-	+	+	+	+	+	+
pH 3,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 7,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hidrólisis									
Caseína	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Almidón	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(+) Prueba positiva, (-) Prueba negativa

4.1.2. Caracterización fenotípica

a) Pruebas nutricionales

Las pruebas nutricionales consistieron en determinar la producción de CO_2 a partir de glucosa y los ensayos de fermentación de diferentes carbohidratos tales como: glucosa, fructosa, galactosa, maltosa, sacarosa, lactosa y celobiosa (Tabla 2).

En **la prueba de producción de CO_2** a partir de glucosa, 30 aislados (77 %) mostraron metabolismo homofermentativo degradando la glucosa sin producir CO_2, mientras que 9 aislados (23 %) presentaron metabolismo heterofermentativo obligado fermentando la glucosa y produciendo CO_2 como uno de los productos finales del proceso (Figura 4).

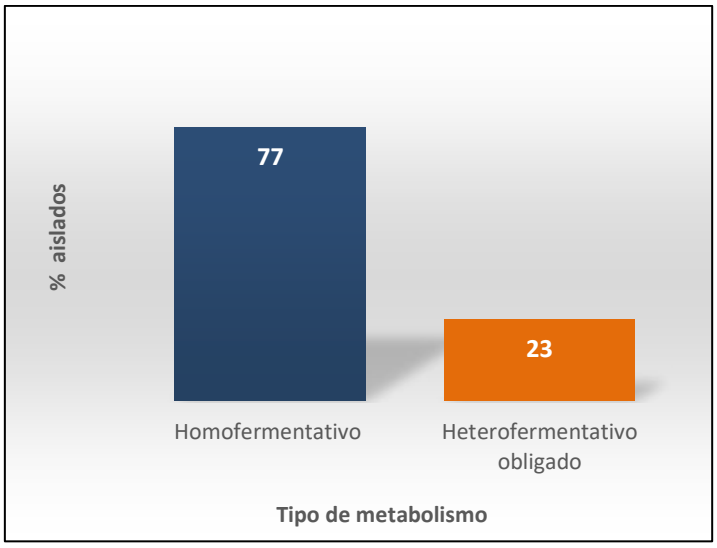


Figura 4. Tipo de metabolismo de las BAL aisladas de frutos de la Región Loreto

La prueba de fermentación de carbohidratos demostró que entre 92 % a 100 % de las BAL aisladas metabolizaron glucosa, fructosa, maltosa y celobiosa; mientras que entre 69 % a 87 % de los aislados fermentaron sacarosa, lactosa y galactosa (Figura 5).

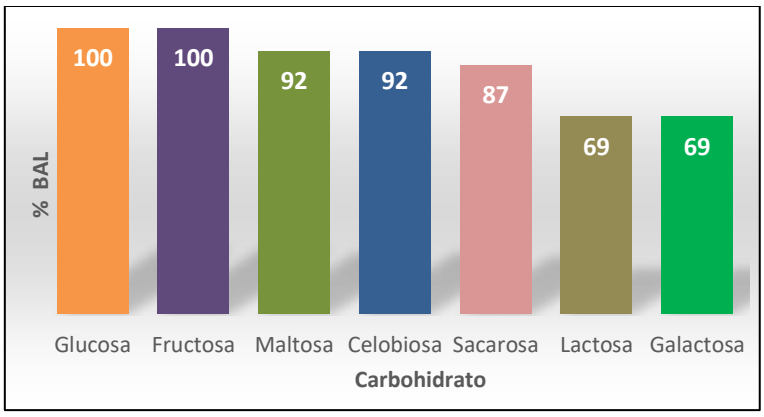


Figura 5. Fermentación de carbohidratos por BAL aisladas de frutos de la Región Loreto

b) Pruebas fisiológicas

En la Figura 6 se presentan las condiciones de crecimiento de las BAL aisladas. Así, la mayoría de los aislados crecieron entre pH 3,5 y 7,5 excepto el aislado BAL12 que no creció a pH 3,5. Con respecto a la concentración de NaCl, el 100 % de las BAL aisladas creció en NaCl 5,0 %, 64 % creció en NaCl 10,0 %, mientras que en NaCl 12,5 % no creció ningún aislado. Considerando la temperatura, casi todas las BAL crecieron entre 10 °C a 45 °C, excepto BAL14 y BAL34 que no crecieron a 45 °C.

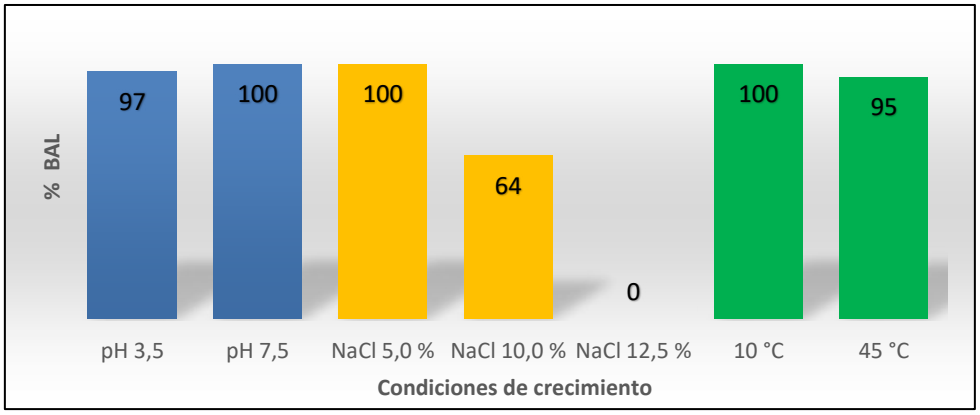


Figura 6. Crecimiento de BAL aisladas de frutos de la Región Loreto a diferentes condiciones de pH, sal y temperatura.

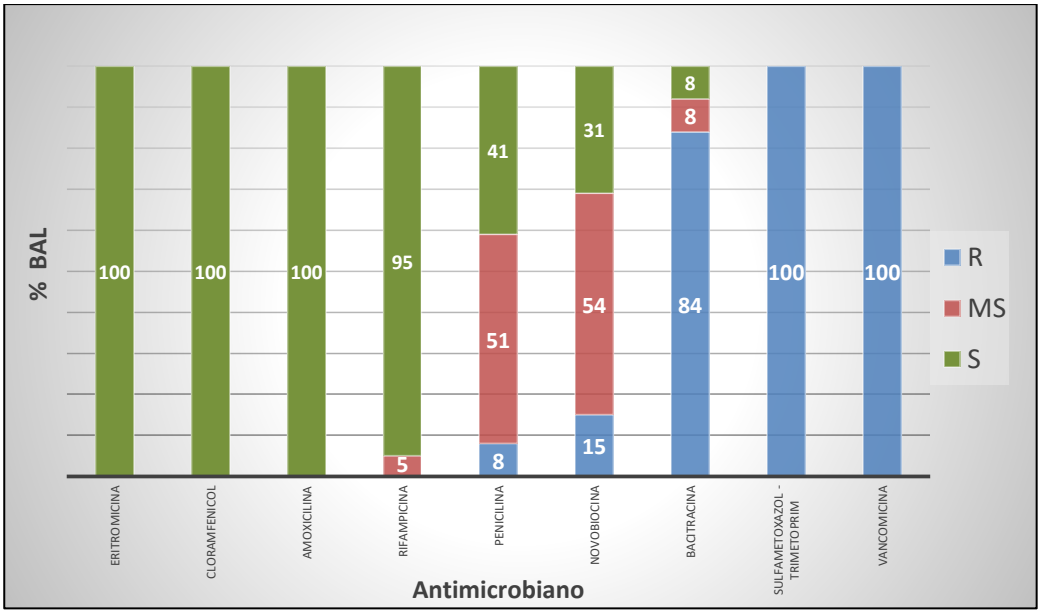
c) Actividad hidrolítica

Las BAL aisladas de frutos no presentaron actividad proteolítica ni amilolítica en las condiciones ensayadas.

d) Sensibilidad antimicrobiana

La sensibilidad antimicrobiana de las BAL aisladas se evaluó mediante la prueba de difusión en disco utilizando: cloranfenicol, amoxicilina, eritromicina, penicilina, rifampicina, bacitracina, novobiocina, sulfametozaxol-trimetoprim y vancomicina. En la Figura 7 se observa que el 100 % de los aislados fue sensible a eritromicina, cloranfenicol y amoxicilina; mientras que el 95 % fue sensible a rifampicina. Asimismo, las BAL presentaron resistencia de 8 %, 15 % y 84 % a penicilina, novobiocina y bacitracina, respectivamente y resistencia total a sulfametoxazol-trimetoprim y vancomicina.

Asimismo, los porcentajes de BAL que presentaron resistencia a dos y tres antimicrobianos fueron 92 % y 8 %, respectivamente.



R, resistente; MS, moderadamente sensible; S, sensible

Figura 7. Prueba de sensibilidad antimicrobiana de las BAL aisladas de frutos de la Región Loreto

Según las características fenotípicas evaluadas, las 39 BAL aisladas de frutos de la Región Loreto se dividieron en los grupos denominados: A, B y C (Tabla 3).

El grupo A está conformado por 30 aislados de morfología bacilar, que poseen metabolismo homofermentativo, metabolizan glucosa, fructosa, maltosa y celobiosa pero presentan diferencias en la fermentación de galactosa, lactosa y sacarosa. Crecen a pH 3,5 y 7,5; en NaCl 5 %; entre 10 °C a 45 °C; el 81 % crece en NaCl 10 % pero no crecen en NaCl 12,5 %. Comparten entre si el mismo patrón de resistencia antimicrobiana.

El grupo B está conformado por los aislados BAL38, BAL39 y BAL9 de morfología bacilar, los cuales poseen metabolismo heterofermentativo obligado, fermentan glucosa y fructosa; pero no fermentan galactosa, sacarosa, maltosa, lactosa ni celobiosa. Crecen a pH 3,5 y 7,5; en NaCl 5 %; entre 10 °C a 45 °C y presentan diferencias en cuanto al crecimiento en NaCl 10 %; comparten entre si el mismo patrón de resistencia antimicrobiana.

El grupo C está conformado por los aislados BAL10, BAL11, BAL12, BAL13, BAL14 y BAL33, los cuales son de morfología cocoide, poseen metabolismo heterofermentativo obligado, fermentan glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa y celobiosa; pero no fermentan galactosa ni lactosa, excepto BAL10 que fermenta galactosa. Los seis aislados crecen a pH 3,5 y 7,5 y en NaCl 5,0 %, excepto el aislado BAL12 que no crece a pH 3,5. Todos los aislados crecen entre 10 °C a 45 °C excepto BAL14 y BAL33 que no crecen a 45 °C. Los seis aislados comparten entre si el mismo patrón de resistencia antimicrobiana pero a diferencia de los aislados de los grupos A y B, estos aislados son sensibles o moderadamente sensibles a bacitracina y resistentes a novobiocina.

Tabla 3. Perfiles fenotípicos de las BAL aisladas de frutos de la Región Loreto

Grupo	Aislado	Morfología	Producción CO2	Glucosa	Fructosa	Galactosa	Sacarosa	Maltosa	Lactosa	Celobiosa	pH 3.5	pH 7.5	NaCl 5 %	NaCl 10 %	NaCl 12.5 %	10 °C	45 °C	RIF	CHL	BAC	NOV	PEN	AMX	ERI	SXT	VAN
A	BAL15	Bacilos	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	S	S	R	MS	MS	S	S	R	R
	BAL16	Bacilos	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	S	S	R	S	S	S	S	R	R
	BAL17	Bacilos	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	S	S	R	S	S	S	S	R	R
	BAL1	Bacilos	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	S	S	R	S	S	S	S	R	R
	BAL37	Bacilos	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	S	S	R	MS	MS	S	S	R	R
	BAL3	Bacilos	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	S	S	R	MS	S	S	S	R	R
	BAL22	Bacilos	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	S	S	R	MS	MS	S	S	R	R
	BAL23	Bacilos	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	S	S	R	MS	MS	S	S	R	R
	BAL18	Bacilos	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	S	S	R	S	S	S	S	R	R
	BAL19	Bacilos	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	S	S	R	MS	MS	S	S	R	R
	BAL20	Bacilos	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	S	S	R	S	S	S	S	R	R
	BAL2	Bacilos	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	S	S	R	MS	MS	S	S	R	R
	BAL21	Bacilos	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	S	S	R	MS	MS	S	S	R	R
	BAL24	Bacilos	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	S	S	R	S	S	S	S	R	R
	BAL25	Bacilos	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	S	S	R	MS	MS	S	S	R	R
	BAL26	Bacilos	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	S	S	R	MS	MS	S	S	R	R
	BAL27	Bacilos	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	S	S	R	MS	MS	S	S	R	R
	BAL28	Bacilos	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	S	S	R	MS	MS	S	S	R	R
	BAL30	Bacilos	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	S	S	R	S	S	S	S	R	R
	BAL6	Bacilos	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	S	S	R	MS	MS	S	S	R	R
	BAL31	Bacilos	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	S	S	R	MS	MS	S	S	R	R
	BAL32	Bacilos	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	S	S	R	S	S	S	S	R	R
	BAL34	Bacilos	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	S	S	R	S	S	S	S	R	R
	BAL35	Bacilos	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	S	S	R	MS	MS	S	S	R	R
	BAL36	Bacilos	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	S	S	R	MS	S	S	S	R	R
	BAL5	Bacilos	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	S	S	R	S	S	S	S	R	R
	BAL29	Bacilos	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	S	S	R	MS	MS	S	S	R	R
	BAL4	Bacilos	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	S	S	R	S	MS	S	S	R	R
	BAL7	Bacilos	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	S	S	R	MS	MS	S	S	R	R
	BAL8	Bacilos	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	S	S	R	MS	MS	S	S	R	R
B	BAL38	Bacilos	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	S	S	R	MS	R	S	S	R	R
	BAL39	Bacilos	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	S	S	R	S	R	S	S	R	R
	BAL9	Bacilos	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	S	S	R	MS	R	S	S	R	R
C	BAL11	Cocoide	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	S	S	S	R	S	S	S	R	R
	BAL12	Cocoide	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	S	S	MS	R	MS	S	S	R	R
	BAL13	Cocoide	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	MS	S	MS	R	MS	S	S	R	R
	BAL14	Cocoide	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	S	S	S	R	S	S	S	R	R
	BAL33	Cocoide	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	S	S	MS	R	S	S	S	R	R
	BAL10	Cocoide	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	MS	S	S	R	S	S	S	R	R

RIF, rifampicina; CHL, cloranfenicol; BAC, bacitracina; NOV, novobiocina; PEN, penicilina; AMX, amoxicilina; ERY, eritromicina; STX, sulfametoxazol-trimetoprim; VAN: vancomicina

4.1.3. Caracterización molecular

4.1.3.1. Extracción de ADN genómico

El ADN genómico de las 39 BAL seleccionadas extraído mediante el método de Dubernet modificado permitió extraer ADN de calidad para su posterior uso en las diferentes pruebas de PCR. En la Figura 8 se presenta el gel de agarosa 1 % conteniendo los ADNs genómicos extraídos de ocho BAL.

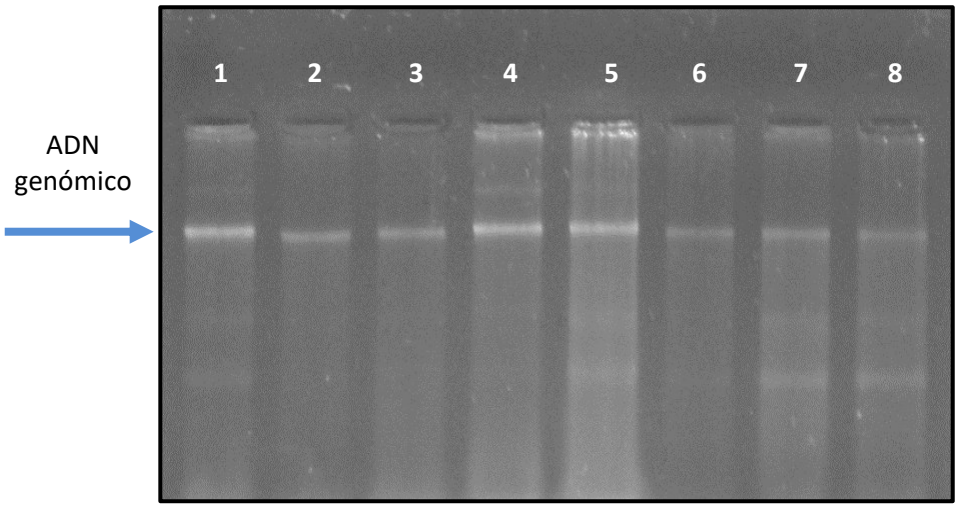


Figura 8. Gel de agarosa 1 % conteniendo ADN genómico de BAL aisladas de frutos de la Región Loreto.

4.1.3.2. ARDRA

Las 39 BAL aisladas fueron caracterizadas mediante ARDRA, para lo cual primero se amplificaron los genes ribosómicos 16S a partir del ADN genómico extraído de cada BAL y posteriormente los amplicones obtenidos se cortaron con enzimas de restricción.

a) Amplificación de los genes ribosómicos 16S

Los productos amplificados presentaron un tamaño de aproximadamente 1500 pb (Figura 9).

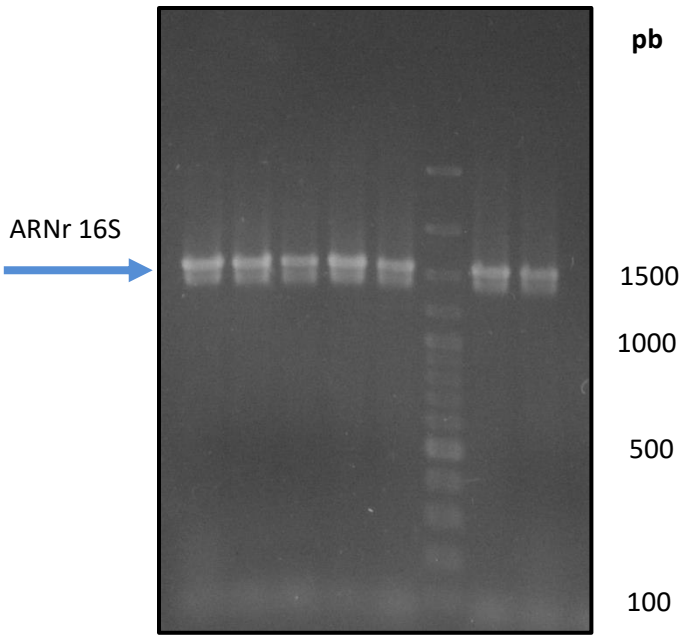


Figura 9. Gel de agarosa 1 % conteniendo los genes ribosómicos 16S amplificados de BAL aisladas de frutos de la Región Loreto. MPM, marcador de peso molecular 100 pb.

b) Digestión con enzimas de restricción

Los genes ribosómicos 16S amplificados fueron digeridos con: *Alu*I, *Hae*III y *Mse*I. Luego, los fragmentos de restricción fueron separados por electroforesis en gel de agarosa 2,5 %.

La digestión con *Alu*I generó cuatro perfiles de bandas (fragmentos) entre 80 pb a 900 pb aproximadamente (Figura 10).

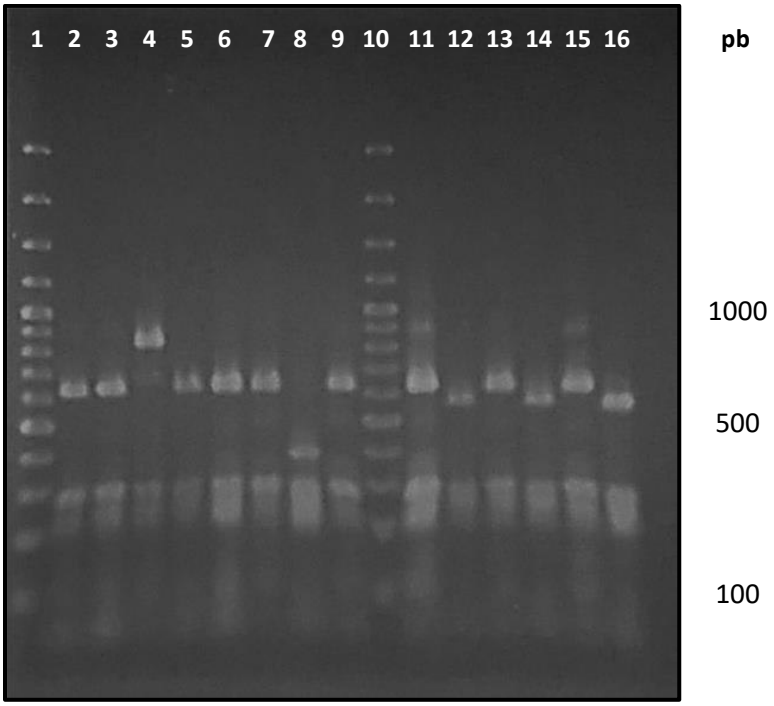


Figura 10. Gel de agarosa 2,5 % mostrando los perfiles de restricción de los genes ribosómicos 16S amplificados y digeridos con *Alu*I de las BAL aisladas. Carriles 1, Marcador 100 pb; 2, BAL5; 3, BAL7; 4, BAL9; 5, BAL15; 6, BAL16; 7, BAL1; 8, BAL10; 9, BAL4; 10, Marcador 100 pb; 11, BAL6; 12, BAL33; 13, BAL22; 14, BAL13; 15, BAL2; 16, BAL11.

La digestión de los genes ribosómicos 16S amplificados con *Hae*III generó tres perfiles de bandas entre 80 pb a 1200 pb aproximadamente (Figura 11).

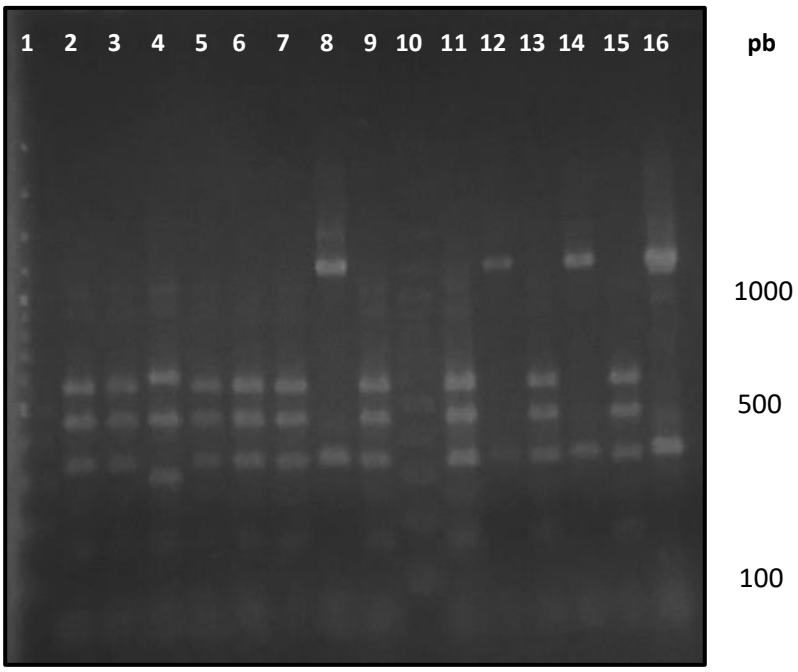


Figura 11. Gel de agarosa 2,5 % mostrando los perfiles de restricción de los genes ribosómicos 16S amplificados y digeridos con *Hae*III de las BAL aisladas. Carriles 1, Marcador 100 pb; 2, BAL5; 3, BAL7; 4, BAL9; 5, BAL15; 6, BAL16; 7, BAL1; 8, BAL10; 9, BAL4; 10, Marcador 100 pb; 11, BAL6; 12, BAL33; 13, BAL22; 14, BAL13; 15, BAL2; 16, BAL11.

La digestión de los genes ribosómicos 16S amplificados con *Mse*I generó tres perfiles de bandas entre 290 pb a 680 pb aproximadamente (Figura 12).

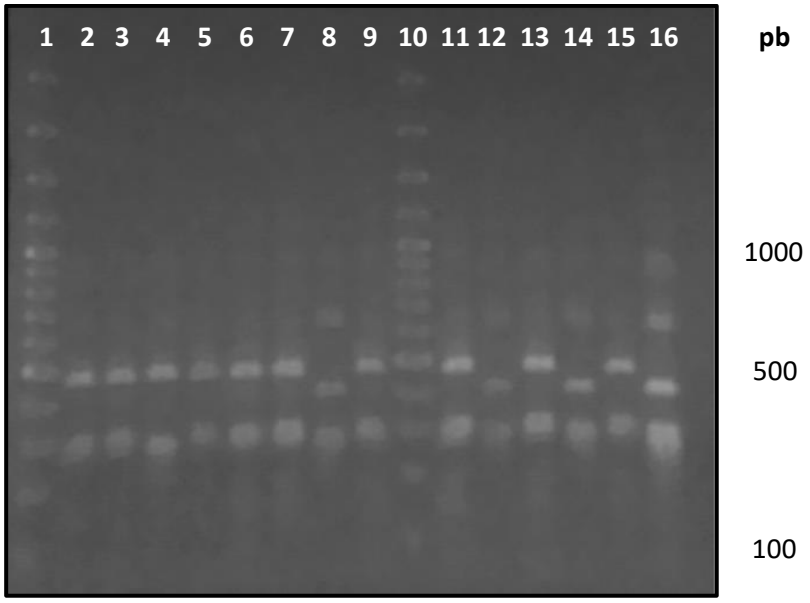


Figura 12. Gel de agarosa 2,5 % mostrando los perfiles de restricción de los genes ribosómicos 16S amplificados y digeridos con *Mse*III de las BAL aisladas. Carriles 1, Marcador 100 pb; 2, BAL5; 3, BAL7; 4, BAL9; 5, BAL15; 6, BAL16; 7, BAL1; 8, BAL10; 9, BAL4; 10, Marcador 100 pb; 11, BAL6; 12, BAL33; 13, BAL22; 14, BAL13; 15, BAL2; 16, BAL11.

4.1.3.3. RISA

La caracterización de las 39 BAL aisladas según esta técnica se realizó en dos pasos: primero se amplificó la región ITS 16S-23S, después el producto amplificado se cortó de manera secuencial con las enzimas *Hae*III y *Taq*I (doble digestión).

a) Amplificación de ITS 16S-23S

La región ITS 16S-23S fue amplificada por PCR, después los productos fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa

2,5 %. Los fragmentos de ADN midieron entre 500 a 800 pb (Figura 13).

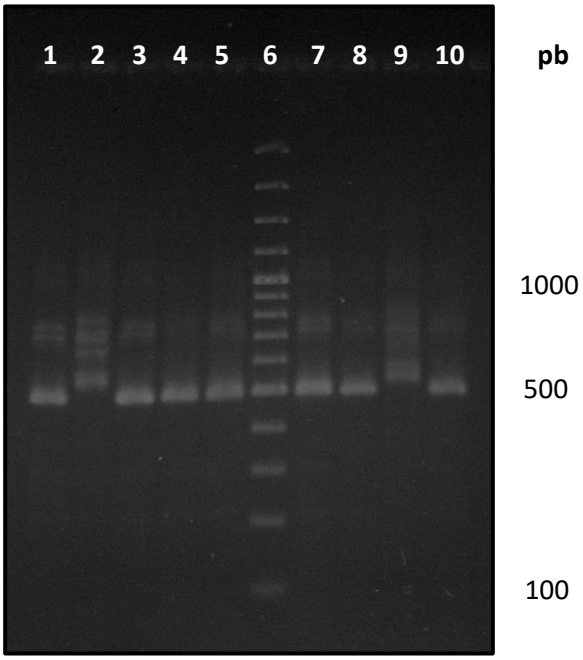


Figura 13. Gel de agarosa 2,5 % conteniendo los espaciadores intergénicos 16S-23S de las BAL aisladas. Carriles 1, BAL22; 2, BAL13; 3, BAL2; 4, BAL18; 5, BAL19; 6, Marcador 100 pb; 7, BAL20; 8, BAL21; 9, BAL14; 10, BAL30.

b) Digestión de ITS 16S-23S

Los productos amplificados de la región ITS 16S-23S fueron digeridos primero con *Hae*III y luego con *Taq*I. Se obtuvieron 4 perfiles de restricción con fragmentos que midieron entre 200 a 550 pb (Figura 14).

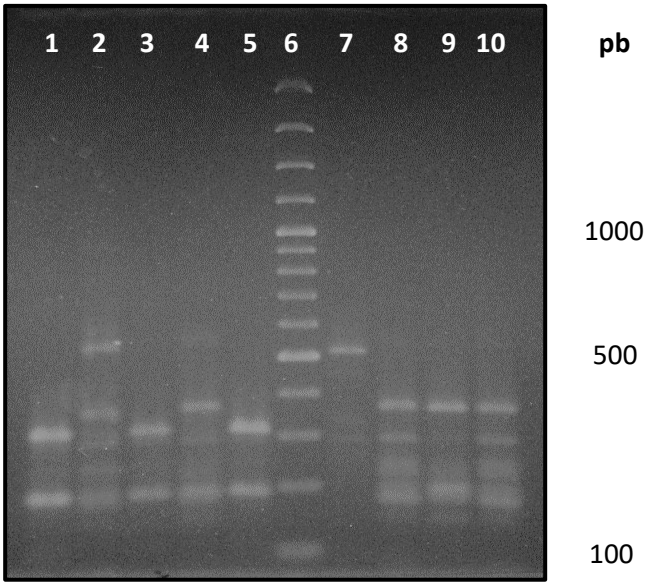


Figura 14. Gel de agarosa 2,5 % conteniendo los perfiles de restricción del segmento ITS 16S- 23S de las BAL aisladas. Carriles 1, BAL22; 2, BAL13; 3, BAL2; 4, BAL18; 5, BAL19; 6, Marcador 100 pb; 7, BAL20; 8, BAL21; 9, BAL14; 10, BAL30.

Según la similitud de los perfiles de restricción obtenidos mediante ARDRA y RISA, las 39 BAL aisladas conformaron cuatro grupos que incluyen a los mismos aislados. Así, 30 aislados mostraron el perfil I, tres aislados presentaron el perfil II, cinco aislados mostraron el perfil III y un aislado presentó el perfil IV (Tabla 4).

4.1.3.4. rep-PCR

La variación intraespecífica de los aislados de BAL se determinó mediante rep-PCR utilizando el cebador GTG_5. La técnica permitió obtener 14 patrones de bandas. En la Tabla 4 se detalla los perfiles rep-PCR de las BAL aisladas y en las Figuras 15 y 16 se muestran los patrones obtenidos.

Tabla 4. Perfiles genéticos de las BAL aisladas de frutos de la Región Loreto

Aislados*	PERFIL		
	ARDRA	**RISA**	**rep-PCR**
BAL15, BAL17, BAL18, BAL1, BAL37, BAL22, BAL23, BAL24, BAL25, BAL26, BAL27, BAL28, BAL30, BAL31, BAL32, BAL35, BAL34, BAL21, BAL19, BAL20	I	I_R	I.1
BAL3, BAL16			I.2
BAL4			I.3
BAL2			I.4
BAL5, BAL29, BAL36			I.5
BAL6			I.6
BAL7			I.7
BAL8			I.8
BAL9, BAL38, BAL39	II	II_R	II.1
BAL11	III	III_R	III.1
BAL12			III.2
BAL13			III.3
BAL14, BAL33			III.4
BAL10	IV	IV_R	IV.1

* En texto celeste se indican los aislados que fueron seleccionados para el secuenciamiento de los genes ribosómicos 16S.

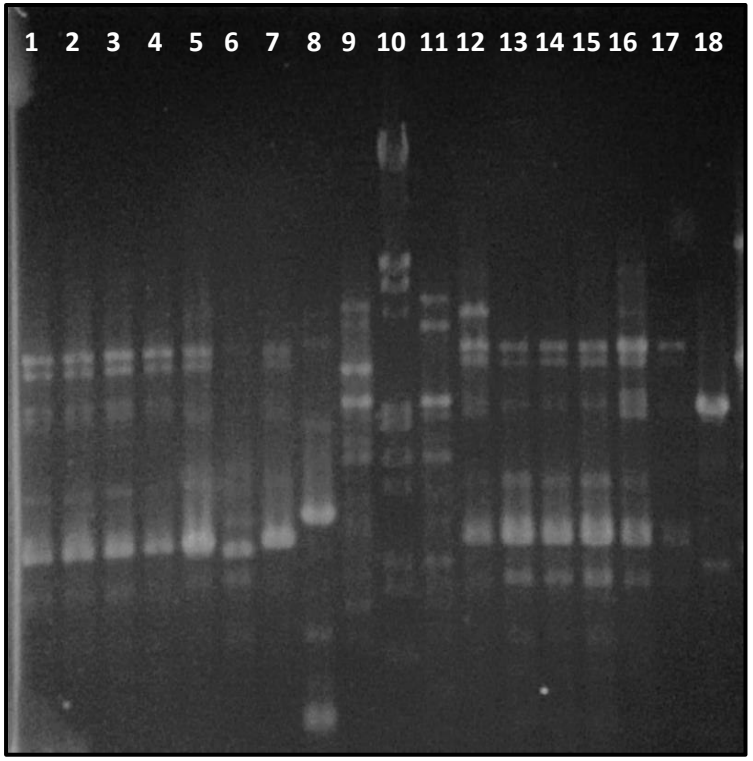


Figura 15. Gel de agarosa 1 % conteniendo los perfiles de rep-PCR de BAL aisladas de frutos de la Región Loreto. Carriles 1, BAL25; 2, BAL26; 3, BAL27; 4, BAL28; 5, BAL8; 6, BAL38; 7, BAL1; 8, BAL10; 9, BAL12; 10, Marcador ADN lambda/*Eco*RI+*Hind*III; 11, BAL13; 12, BAL3; 13, BAL5; 14, BAL29; 15, BAL36; 16, BAL37; 17, BAL17; 18, BAL33.

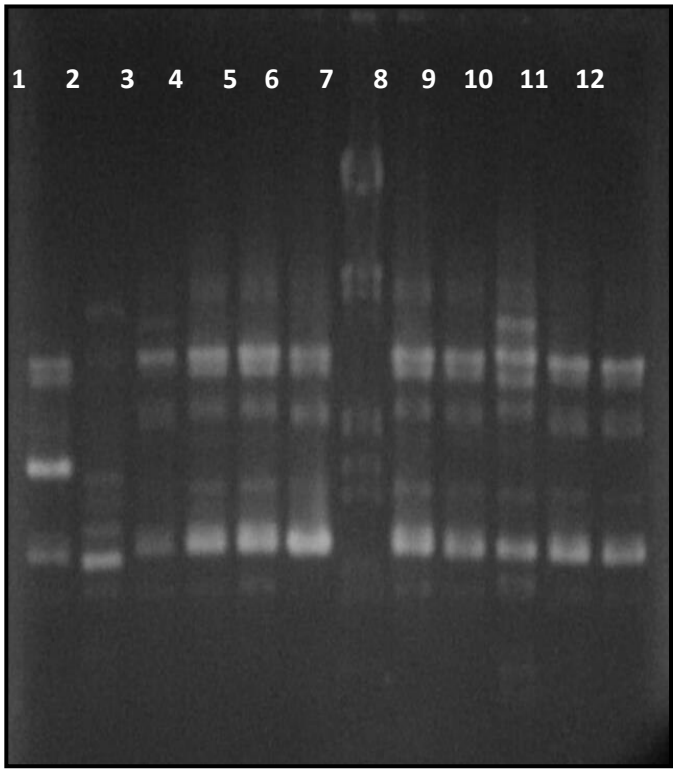


Figura 16. Gel de agarosa 1 % conteniendo los perfiles de rep-PCR de BAL aisladas de frutos de la Región Loreto. Carriles 1, BAL7; 2, BAL39; 3, BAL16; 4, BAL31; 5, BAL32; 6, BAL34; 7, Marcador ADN lambda/*Eco*RI+*Hind*III; 8, BAL35; 9, BAL22; 10, BAL2; 11, BAL18; 12, BAL19.

4.1.3.5. Secuenciamiento de los genes ribosómicos 16S

Para la secuenciación de los genes ribosómicos 16S, se seleccionaron 18 aislados teniendo en cuenta sus características fenotípicas y perfiles ARDRA, RISA y rep-PCR (Tabla 4).

Las secuencias de los genes ribosómicos fueron analizadas y comparadas con aquellas depositadas en las bases de datos (GenBank). Se identificaron 4 especies de BAL, resultado que fue concordante con los 4 perfiles de restricción obtenidos mediante ARDRA y RISA. Así, los 30 aislados del grupo I pertenecieron a *Lactobacillus plantarum*, los tres aislados del grupo II a *Lactobacillus brevis*, los cinco del grupo III a *Weissella cibaria* y el aislado del grupo IV fue identificado como *Weissella confusa* (Tabla 5).

Tabla 5. Análisis de las secuencias de los genes ribosómicos 16S de las BAL aisladas de frutos de la Región Loreto.

Aislados	PERFIL			Especie	Similitud de secuencia (%)	N° acceso Genbank*
	ARDRA	RISA	rep-PCR			
BAL1 BAL20 BAL21 BAL24	I	I_R	I.1	*Lactobacillus plantarum*	99,9 – 100	KY977384 MF371316 MF371317 MF371319
BAL2			I.2			KY977388
BAL3			I.3			KY977397
BAL4			I.4			KY977386
BAL5 BAL36			I.5			KY977393 MF371318
BAL6			I.6			KY977394
BAL7			I.7			KY977399
BAL8			I.8			KY977398
BAL9	II	II_R	II.1	*Lactobacillus brevis*	100	KY977400
BAL11	III	III_R	III.1	*Weissella cibaria*	99,9 – 100	KY977390
BAL12			III.2			KY977391
BAL13			III.3			KY977392
BAL14			III.4			KY977395
BAL10	IV	IV_R	IV.1	*Weissella confusa*	99,9	KY977385

* Número de acceso de las secuencias de los genes ribosómicos 16S de las BAL aisladas de frutos de la Región Loreto depositadas en la base de datos del NCBI.

Con las secuencias nucleotídicas de los genes ribosómicos 16S de las BAL se construyó un árbol filogenético utilizando el programa Mega versión 7.0 aplicando el método de Neighbor-joining y bootstrap de 1000, para el análisis se incluyeron además secuencias de los genes ribosómicos 16S de varias cepas de referencia depositadas en la base de datos del GenBank (Figura 17, Tabla 6).

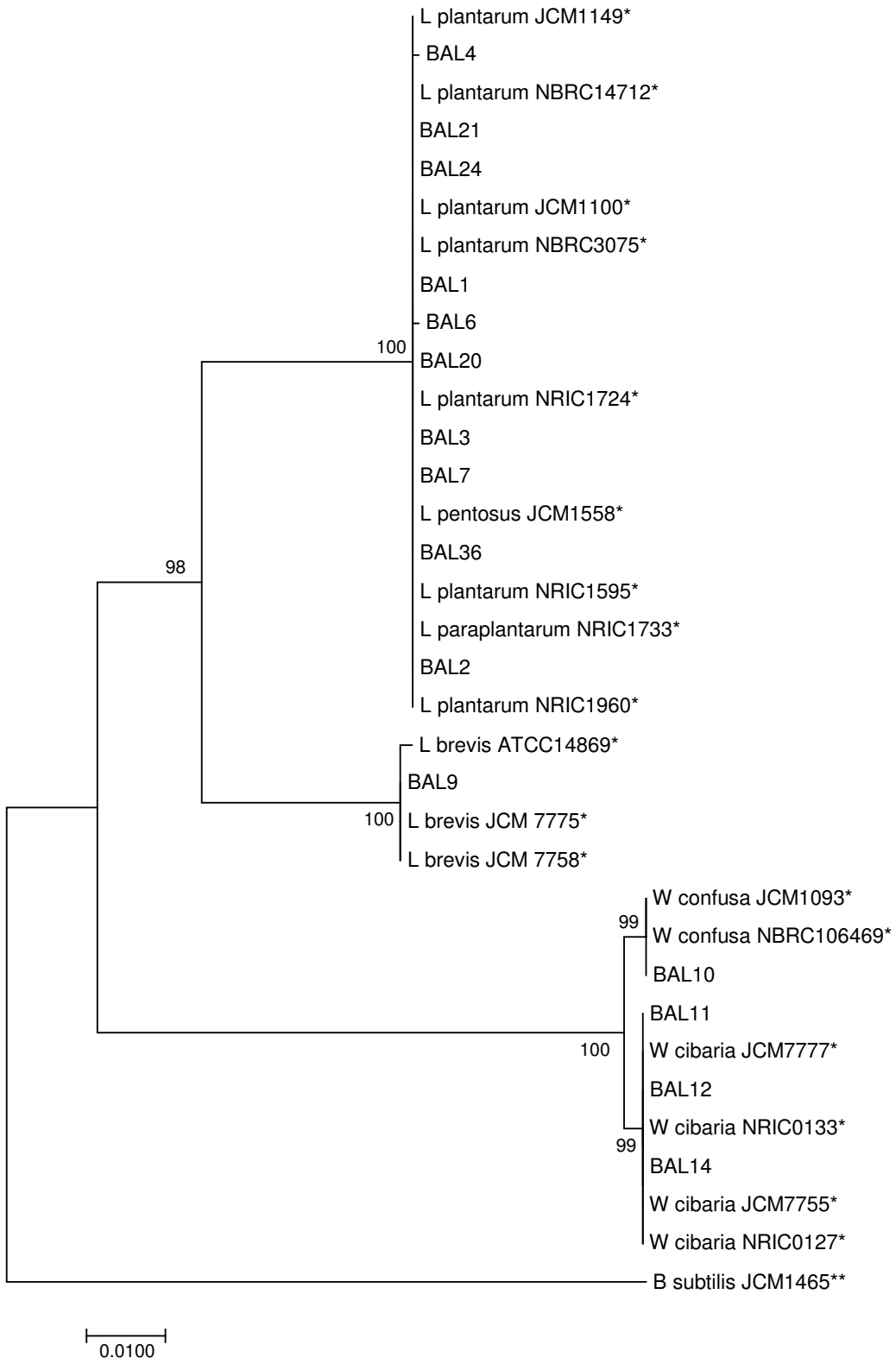


Figura 17. Arbol filogenético de BAL aisladas de frutos de la Región Loreto basado en las secuencias de los genes ribosómicos 16S. Método de Neighbor-Joining y bootstrap 1000. Los números en los nudos corresponden al porcentaje de bootstrap. La barra representa 1 % de divergencia en las secuencias. *Cepas de referencia de BAL. **Cepa outgroup.

Tabla 6. Número de acceso de las secuencias de genes ribosómicos 16S de cepas bacterianas utilizadas en la construcción del árbol filogenético de las BAL aisladas de frutos de la Región Loreto.

Cepa bacteriana	N° acceso de secuencia nucleotídica de los genes ribosómicos 16S
L. plantarum JCM 1149	NR_115605.1
L. plantarum JCM 1100	AB690244.1
L. plantarum NBRC 14712	AB680651.1
L. plantarum NBRC 3075	AB680005.1
L. plantarum NRIC 1724	AB362733.1
L. plantarum NRIC 1595	AB362729.1
L. plantarum NRIC 1960	AB362769.1
L. paraplantarum NRIC 1733	AB362736.1
L. pentosus JCM 1558	LC071808.1
L. brevis ATCC 14869	NR_044704.1
L. brevis JCM 7775	AB911501.1
L. brevis JCM 7758	AB911493.1
W. confusa JCM 1093	NR_040816.1
W. confusa NBRC 106469	AB682449.1
W. cibaria JCM 7777	AB911503.1
W. cibaria JCM 7755	AB911490.1
W. cibaria NRIC 0127	AB362608.1
W. cibaria NRIC 0133	AB362614.1
B. subtilis JCM 1465	NR_113265.1

4.1.3.6. Amplificación del gen *rec*A para la diferenciación de *Lactobacillus plantarum, L. pentosus* y *L. paraplantarum*.

Para confirmar la identidad de los aislados del grupo I se amplificó el gen *rec*A, marcador filogenético que según lo reportado por Torriani et al. (2001) permite diferenciar a *Lactobacillus plantarum, L. pentosus* y *L. paraplantarum* por la diferencia en el tamaño de los amplicones obtenidos.

El tamaño del gen *rec*A amplificado fue de 320 pb aproximadamente, lo cual permitió confirmar que las BAL del grupo I pertenecen a *L. plantarum* (Figura 18).

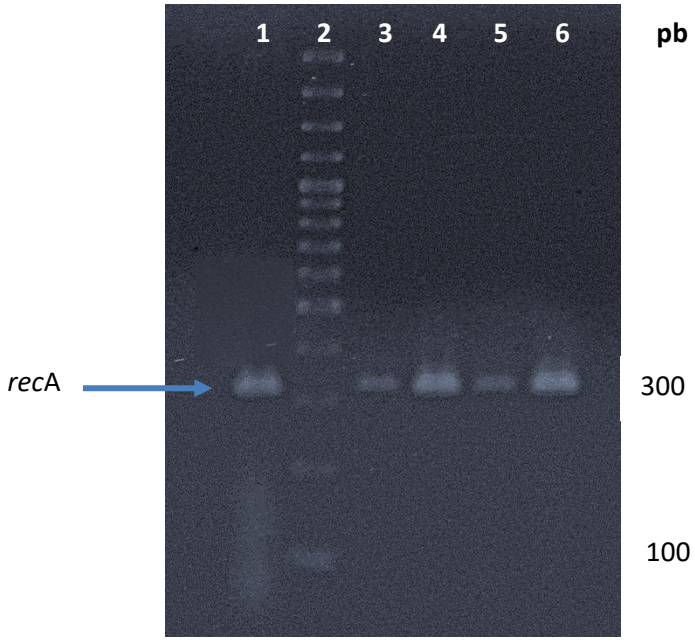


Figura 18. Gel de agarosa 1 % conteniendo gen *rec*A de BAL pertenecientes al grupo I aisladas de frutos de la Región Loreto. Carriles 1, BAL6; 2, Marcador 100 pb; 3, BAL2; 4, BAL3; 5, BAL19; 6, BAL21.

4.1.4. Evaluación del potencial biotecnológico

4.1.4.1. Producción de EPS

Las BAL aisladas se sembraron en agar MRS conteniendo glucosa, fructosa, sacarosa y maltosa de manera independiente. En estas condiciones solo se produjo EPS en presencia de sacarosa.

Las BAL que produjeron EPS fueron: BAL10, BAL11, BAL12, BAL13, BAL14, BAL19, BAL20 y BAL33. En la Figura 19 se observan colonias de aspecto mucoso en las cepas BAL10, BAL11 y BAL12 que indican la presencia de EPS.

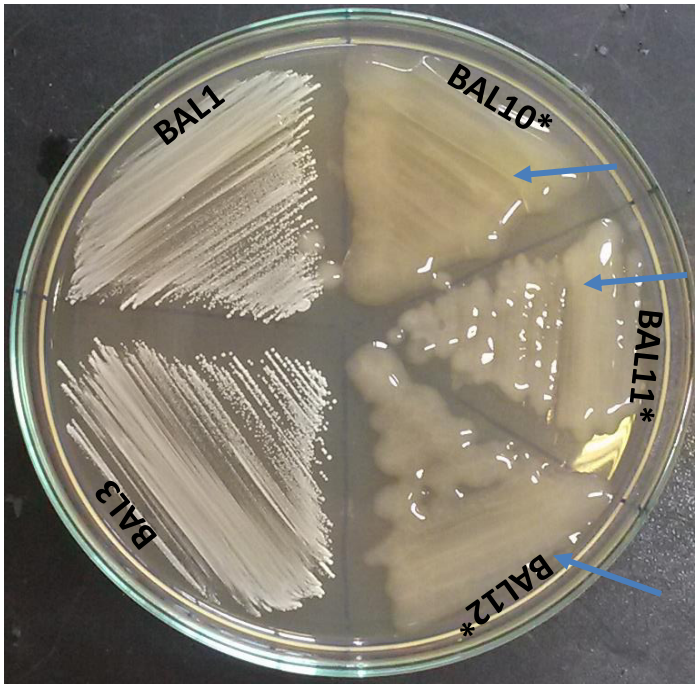


Figura 19. BAL aisladas de frutos de la Región Loreto productoras de EPS (*cepas productoras de EPS).

4.1.4.2. Producción de ácido láctico

Las BAL aisladas produjeron ácido láctico en diferentes concentraciones. Así, nueve aislados correspondientes a cepas heterofermentativas (BAL9, BAL10, BAL11, BAL12, BAL13, BAL14, BAL33, BAL38 y BAL 39) produjeron entre 12 a 17 g/L de ácido láctico, mientras que los 30 aislados homofermentativos restantes produjeron entre 20 a 23 g/L de este compuesto (Figura 20). El rendimiento de ácido láctico ($Y_{P/S}$) de las cepas homofermentativas en todos los casos fue mayor al 100 % (Figura 21).

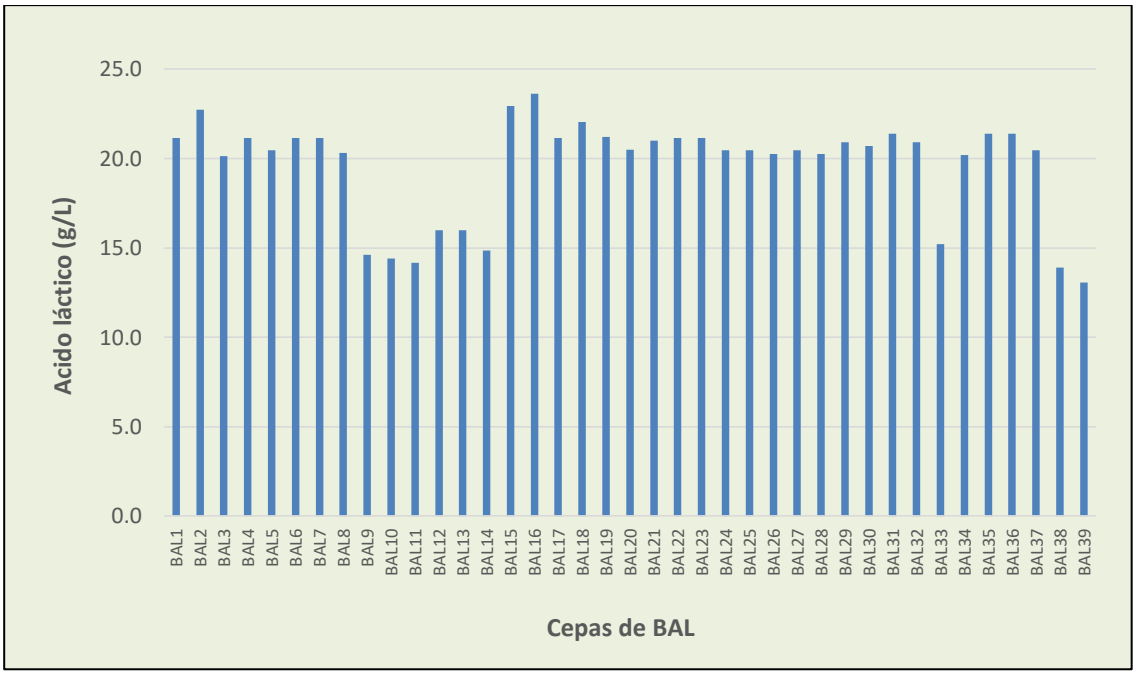


Figura 20. Concentración de ácido láctico producido por BAL aisladas de frutos de la Región Loreto

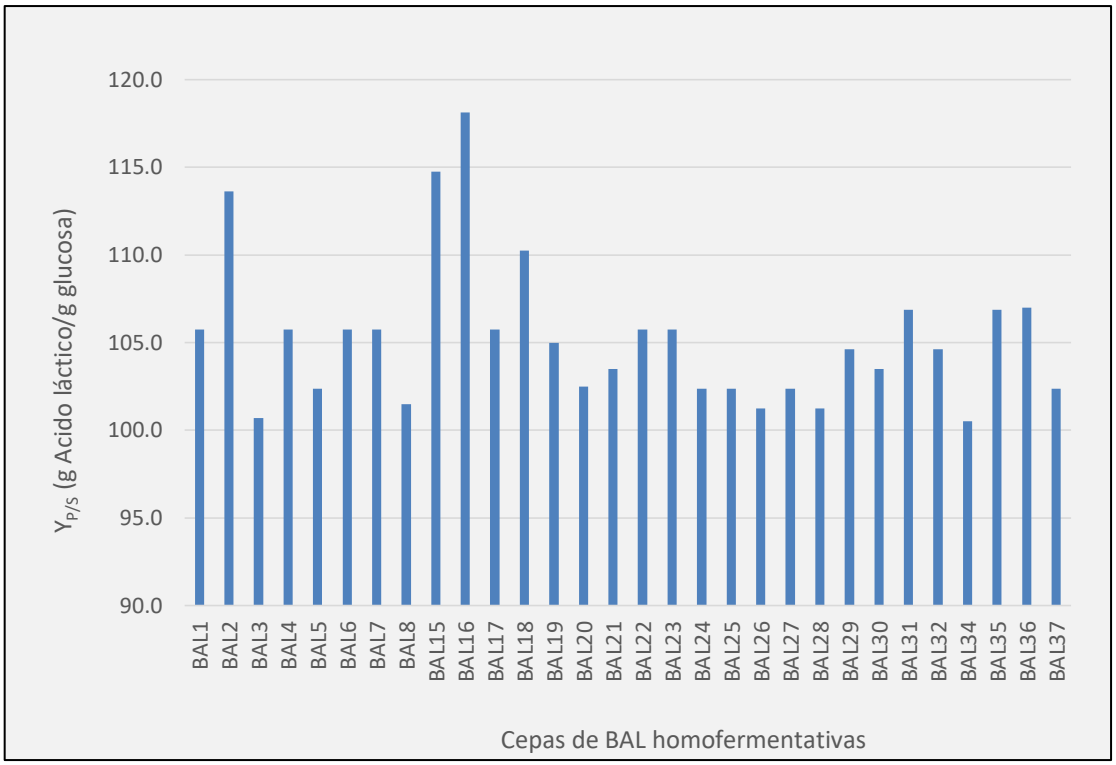


Figura 21. Rendimiento de ácido láctico de cepas de BAL homofermentativas

4.2. Discusión

4.2.1. Del aislamiento y selección de BAL

La Región Loreto ubicada en la Amazonía peruana registra promedios anuales de temperatura, humedad y precipitación superiores a los presentados en otras regiones de Perú (https://www.inei.gob.pe/estadisticas/indice-tematico/climate/), estas condiciones ambientales favorecen una gran diversidad biológica. Así, la región Loreto y alrededores de la ciudad de Iquitos son áreas con gran variedad de frutales comestibles en la Amazonía. En esta zona se han descrito 162 especies de frutas consumidas por los pobladores locales, de las cuales hasta 100 especies son comercializadas en los mercados iquiteños. Los frutales nativos amazónicos constituyen una de las fuentes más ricas de nutrientes para la alimentación humana, de animales silvestres y domésticos, así como materia prima para la agroindustria regional (Gonzales, 2007).

Los frutos amazónicos, debido a las condiciones climáticas en las que crecen, poseen características únicas para el desarrollo de una variedad de microorganismos entre los cuales se encuentran bacterias y hongos. La mayoría de microorganismos que se observan en la superficie de frutas y vegetales son habitantes del suelo, miembros de una gran diversidad microbiana que colectivamente son responsables de mantener un equilibrio ecológico dinámico dentro de los sistemas agrícolas. Estos microorganismos son diseminados a través de partículas del suelo, agua de riego y prácticas culturales. La mayoría de microorganismos son benignos y en muchos casos proveen una barrera biológica natural contra la infestación de los frutos por agentes patógenos (Leff & Fierer, 2013; Barth et al., 2009). Por ello, al igual que los recursos de flora y fauna, los microorganismos forman parte de la biodiversidad existente en la Región Amazónica.

Con el objetivo de aislar BAL se recolectaron 14 frutos de la Región Loreto (Anexo 1), de los cuales se obtuvieron 70 aislados bacterianos y se seleccionaron 39 que presentaron características presuntivas de BAL (Tabla 2), los mismos que fueron caracterizados fenotípica y molecularmente. De los 39 aislados, el 85 % fue de morfología bacilar y el 15 % de forma cocoide. Los bacilos proceden de 11 frutos, mientras que los de morfología cocoide solo fueron aislados a partir de guayaba y pijuayo. Las investigaciones reportan que las BAL aisladas con mayor frecuencia pertenecen al género *Lactobacillus;* así, Chen et al. (2010); Di Cagno et al. (2010); Emerenini et al. (2013) y Nyanga et al. (2007) reportan que los microorganismos aislados con mayor frecuencia a partir de frutos corresponden a *Lactobacillus;* por ello, el porcentaje tan alto de bacilos aislados en la presente investigación es concordante con la información descrita.

No fue posible realizar el aislamiento de BAL a partir de carambola, camu camu y aguaje. Es posible que el método de enriquecimiento utilizado no fuera adecuado para el desarrollo de las BAL que habitan la superficie de estos frutos o que la presencia de otros microorganismos colonizando su superficie haya generado cierto tipo de competencia por los nutrientes disponibles dejando en

desventaja a las BAL; asimismo, factores intrínsecos como la gran acidez dada por el alto contenido de vitamina C, la cutícula serosa o el periodo de maduración de estas frutas podrían ser condiciones que dificultaron el desarrollo de BAL en estos frutos (Barrera & Hernández, 2004; Leff & Fierer, 2013; Azevêdo et al., 2015).

4.2.2. De la caracterización fenotípica

La prueba de producción de CO_2 (Figura 4) permitió determinar el tipo de metabolismo de las BAL y constituyó una guía en la identificación de los aislados. Esta prueba junto a otras características fenotípicas permiten determinar de forma presuntiva la identidad de los microorganismos. Así por ejemplo, el 77 % de BAL aisladas presentó metabolismo homofermentativo o heterofermentativo obligado y morfología bacilar, dichas características están asociadas con el género *Lactobacillus* (Holzapfel & Wood, 2014). El 23 % de BAL presentó metabolismo heterofermentativo obligado y morfología cocoide, características de los géneros *Leuconostoc, Oenococcus* o *Weissella* (Holzapfel & Wood, 2014).

La determinación del tipo de metabolismo en las BAL es importante para su uso en procesos industriales. Así, en la producción industrial de ácido láctico, se prefieren BAL homofermentativas que conviertan los azúcares en ácido láctico por la vía de EMP como único producto final. Por el contrario, las BAL heterofermentativas generan, además de ácido láctico, otros metabolitos que requieren procesos posteriores de purificación (Carr et al., 2002).

La prueba de fermentación de carbohidratos (Figura 5) demostró que entre el 87 % al 100 % de BAL aisladas fermentaron tanto monosacáridos como disacáridos entre los que se incluyen glucosa, fructosa, celobiosa, maltosa y sacarosa, hecho que es concordante con lo descrito para las BAL, las cuales poseen altos requerimientos energéticos y tienen la propiedad de fermentar una amplia variedad de carbohidratos a partir de los cuales obtienen la energía

necesaria para su desarrollo (Mazzoli et al., 2014). Por ello los frutos que contienen azúcares como fructosa, sacarosa y glucosa son fuentes propicias para el desarrollo de BAL (Serpen, 2012).

El 31 % de las BAL seleccionadas no fermentaron lactosa ni galactosa, esta característica es típica de especies del género *Weissella* (Fusco et al., 2015), por lo que este criterio podría ser de ayuda en la identificación de las BAL aisladas de frutos.

Asimismo, se observa que la mayoría de aislados comparte el mismo patrón de fermentación de carbohidratos con algunas diferencias en la fermentación de galactosa, sacarosa y lactosa. Estas variaciones metabólicas permiten inferir la existencia de distintas especies o cepas en las BAL aisladas. La variabilidad fenotípica es reconocida en el género *Lactobacillus* y específicamente en *L. plantarum*, tal variabilidad se manifiesta en cepas que muestran características atípicas a las usualmente reportadas (Pot et al., 1994).

El uso de patrones de fermentación de carbohidratos en la identificación de las BAL es útil. Sin embargo, esta prueba tiene algunas desventajas pues los resultados algunas veces son variables incluso cuando se usan sistemas estandarizados como API o Biolog. Asimismo, algunas especies presentan variabilidad intraespecífica que se puede explicar por la presencia de plásmidos o por cambios puntuales en los genes por efecto de condiciones extremas de temperatura, concentración de azúcares, humedad, pH, entre otras (Pot et al., 1994).

Las pruebas fisiológicas demostraron que las BAL crecieron a diferentes condiciones de pH, temperatura y concentración salina.

Entre 97 a 100 % de los aislados creció a pH 3,5 y 7,5 (Figura 6), sin embargo el aislado BAL12 no creció a pH 3,5 pero si a pH 7,5 (Tabla 2). Estas características son concordantes con lo descrito por Ni et al. (2015), quienes

reportaron que diversas especies de *Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus, Enteroccoccus y Lactococcus* procedentes de ensilados de arroz, crecieron en un rango de pH entre 3,5 a 7,0. A la vez, Kunene et al. (2000) aislaron y caracterizaron BAL de alimentos a base de sorgo y reportaron que los aislados correspondientes a los géneros *Lactobacillus, Leuconostoc* y *Pediococcus* crecieron a pH 3,9. Asimismo, Reginensi et al. (2013) describieron algunas cepas de *Pediococcus* capaces de crecer a pH 4,4. Además, Ludwig et al. (2009) indicaron que las especies del género *Lactobacillus* son un grupo muy heterogéneo de bacterias que crecen en condiciones ácidas a pH entre 5,4 a 6,4 y cesan su crecimiento cuando el medio alcanza valores cercanos a pH 3,6 a 4,0; una excepción es *Lactobacillus suebicus* que crece a pH 2,8 (Kleynmans et al., 1989). La información descrita demuestra que el crecimiento en el rango de pH entre 3,5 a 7,5, es propio de diversos géneros de BAL.

Respecto a la temperatura, el 95 % al 100 % de los aislados crecieron entre 10 °C a 45 °C (Figura 6), las excepciones fueron los aislados BAL14 y BAL33 que no crecieron a 45 °C (Tabla 2). De manera similar al pH, el rango de temperatura en el que desarrollan las BAL es amplio. Así, aislados de los géneros *Lactobacillus, Lactococcus, Pediococcus, Leuconostoc y Weissella* crecen entre 8 °C a 45 °C (Banwo et al., 2012; Du Toit et al., 2001; Fusco et al., 2015; Ni et al., 2015; Trias et al, 2008). Aunque los resultados obtenidos informan sobre la capacidad de las BAL para adaptarse y crecer a diferentes temperaturas, no permitieron establecer por si mismos patrones que las diferencien.

En cuanto al crecimiento de las BAL a diferentes concentraciones de NaCl, se observó que conforme la concentración de sal se incrementa en el medio, el porcentaje de crecimiento de los aislados fue menor, reduciéndose a 69 % con NaCl 10 % y no crecieron con NaCl 12,5 % (Figura 6). Teniendo en cuenta la morfología, el 76 % (25/33) de aislados de morfología bacilar creció en NaCl 10 %. Diversas publicaciones reportan el crecimiento de especies del género *Lactobacillus* en NaCl entre 6,5 % y 10 % (Carr et al., 2002). Esta información sobre la tolerancia salina, sumada a la morfología bacilar y al tipo de

metabolismo homofermentativo de los aislados es concordante con miembros del género *Lactobacillus,* aun cuando se observaron algunas excepciones (BAL26, BAL27, BAL18, BAL8, BAL19, BAL20, BAL38 y BAL39) (Tabla 2) que pueden ser propias de variabilidad intraespecífica. Asimismo, se observó que los aislados de morfología cocoide que no crecieron en NaCl 10,0 % a su vez son heterofermentativos obligados, estas características son concordantes con BAL pertenecientes a los géneros *Leuconostoc* o *Weissella* aunque en la mayoría de investigaciones relacionadas a tolerancia salina, el crecimiento solo fue evaluado hasta 6,5 % (Adiguzel & Atasever, 2009; Chambel et al., 2006; Fusco et al., 2015; Ludwig et al., 2009).

Respecto a la actividad hidrolítica, las BAL aisladas de frutos no hidrolizaron caseína ni almidón. Existen diferentes publicaciones que reportan el aislamiento de BAL proteolíticas y amilolíticas procedentes de fuentes ricas en proteínas (productos lácteos) o almidón (bebidas a base de cereales) respectivamente. (Díaz-Ruiz et al., 2003; Hattingh et al., 2015; Kıvanç & Yapıcı, 2015; Moulay et al., 2006). Endo & Dicks (2014) señalan que las BAL han evolucionado para adaptarse a nichos específicos, ganando genes específicos y perdiendo otros, en este mismo sentido Kelly et al. (2010) reportaron que una cepa de *Lactococcus lactis* utilizada en la industria láctea evolucionó a partir de cepas de *L. lactis* de origen vegetal y que la adaptación de la cepa al medio lácteo implicó la pérdida de diversas funciones y la adquisición de genes que le facilitan su crecimiento en leche. Teniendo en cuenta estas observaciones, resulta explicable que las BAL aisladas de frutos en los que el contenido de proteínas y almidón son reducidos, no degraden ninguno de estos compuestos.

La prueba de sensibilidad antimicrobiana (Figura 7)**,** indicó que el 100 % de las BAL aisladas presentó sensibilidad a: cloranfenicol, eritromicina, amoxicilina y rifampicina. Para el caso de **cloranfenicol y eritromicina**, los resultados son similares a los de Neethu et al. (2015), Ammor et al. (2007) y Patel et al. (2012) quienes señalan que la mayoría de especies de *Lactobacillus* son susceptibles a antimicrobianos que inhiben la síntesis de proteínas como el cloranfenicol y la

eritromicina, los cuales se unen a la subunidad 50S del ribosoma bloqueando la actividad de la enzima peptidil transferasa. Otros autores también han resaltado la susceptibilidad de especies de los géneros *Lactococcus, Streptococcus, Pediococcus* y *Leuconostoc* (Ammor et al., 2007) a eritromicina y cloranfenicol. Además, la resistencia de cepas de *Lactobacillus, Leuconostoc* y *Weissella* a estos antimicrobianos ha sido también documentada (Abriouel et al., 2015; Flórez et al., 2016; Sharma et al., 2014).

Respecto a la sensibilidad de BAL a **amoxicilina**, los resultados concuerdan con lo reportado por Gad et al. (2014) quienes investigaron 244 aislados de BAL comprobando la alta susceptibilidad de los mismos a amoxicilina, un antibiótico que pertenece a la familia de los β-lactámicos y que actúa inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana. Asimismo, el 95 % de BAL son sensibles a **rifampicina**, resultado similar a lo reportado por Charteris et al. (1998) y D'Aimmo et al. (2007) quienes observaron que cepas de *Lactobacillus, Streptococcus* y *Bifidobacterium* fueron sensibles a este antimicrobiano, el cual actúa inhibiendo la síntesis de ácidos nucleicos a nivel de la ARN polimerasa. Del mismo modo, Ammor et al. (2007) señalan que la mayoría de especies de *Leuconostoc* son sensibles a rifampicina.

La prueba de sensibilidad a antimicrobianos no solo permitió determinar la susceptibilidad de los aislados frente a los cuatro antimicrobianos mencionados en los párrafos anteriores, sino también demostró que las BAL aisladas presentan niveles de resistencia variable; así, 8 % a penicilina, 15 % a novobiocina, 90 % a bacitracina y 100 % a sulfametoxazol-trimetoprim y vancomicina.

Respecto a **penicilina**, el porcentaje de resistencia observado en los aislados de BAL fue de 8 % (BAL9, BAL38, BAL39), resultado que concuerda con lo reportado por Han et al. (2015) y Gad et al. (2014), quienes observaron hasta 38 % de resistencia a penicilina en cepas de *Lactobacillus.* De la misma manera, Agarwal et al. (2014) reportaron resistencia a este antibiótico en cepas de *Leuconostoc* aisladas de la raíz de vegetales. Contrariamente, Abriouel et al.

(2015) y Neethu et al. (2015) indican que los lactobacilos son usualmente sensibles a las penicilinas. Esta información demuestra que existe variabilidad en la respuesta de las BAL frente a penicilina.

En relación a **novobiocina**, se observó resistencia en las BAL de morfología cocoide (BAL10, BAL11, BAL12, BAL13, BAL14 y BAL33), todo lo contrario ocurrió en los bacilos. Este resultado es comparable con lo reportado por D'Aimmo et al. (2007), Zhou et al., (2005) y Sozzi & Smiley (1980) quienes encontraron entre 97 % a 100 % de sensibilidad a novobiocina en aislados de *Lactobacillus*. Sin embargo, al igual que ocurre con otros antimicrobianos, también se han reportado cepas de *Lactobacillus casei* resistentes a novobiocina (Saranya & Hemashenpagam, 2011), así como algunas cepas de *Lactobacillus delbrueckii, Lactobacillus bulgaricus y S. thermophilus* (Akpinar et al., 2011; Sozzi & Smiley, 1980) y una cepa de *Weissella jogaejeotgali* (Lee et al., 2015), aunque la información es limitada respecto a este antibiótico y las concentraciones investigadas no coinciden con las evaluadas en la presente investigación.

Las BAL de morfología bacilar presentaron el 90 % de resistencia a **bacitracina**, mientras que los seis aislados de morfología cocoide fueron sensibles o moderadamente sensibles a este antimicrobiano. Las investigaciones relacionadas a la respuesta de BAL frente a bacitracina muestran resultados variables. Por una parte, Bernardeau et al. (2008); Mathur & Singh (2005) y Sharma et al. (2016) indican que como regla general *Lactobacillus* posee una alta resistencia natural a bacitracina, lo cual apoya los resultados obtenidos en el presente estudio. Por otra parte, Abriouel et al. (2015) y Ammor et al. (2007) indican que la susceptibilidad a este antimicrobiano es variable según las investigaciones realizadas por Coppola et al. (2005) y Katla et al. (2001). Asimismo, Agarwal et al. (2014), D'Aimmo et al. (2007) y Zdolec et al. (2011), reportaron cepas de *Lactobacillus y Leuconostoc* sensibles a bacitracina.

Respecto a **sulfametozaxol - trimetoprim y vancomicina** todas las BAL aisladas presentaron resistencia a estos antimicrobianos. De manera similar, se ha reportado que en general las BAL son naturalmente resistentes a los glicopéptidos (vancomicina) y a los inhibidores de la síntesis de ácido fólico (sulfonamidas y trimetoprim) (Abriouel et al., 2015; Neethu et al., 2015).

Algunas BAL especialmente las del género *Lactobacillus* son ampliamente conocidas por su uso como probióticos en alimentos. Sin embargo, en los últimos años ha surgido una preocupación creciente debido a la posibilidad de que las BAL puedan constituir un reservorio de genes de resistencia a antimicrobianos que sean transferidos horizontalmente (por medio de plásmidos y transposones conjugativos, integrones o secuencias de inserción) a patógenos en su paso por el tracto gastrointestinal; de allí la importancia de determinar previamente los patrones de resistencia a antimicrobianos como un requisito para su uso como probiótico.

En términos generales, las BAL aisladas tienen una alta sensibilidad a seis de los nueve antimicrobianos evaluados. Sin embargo, un gran porcentaje presenta resistencia a bacitracina, sulfametoxazol-trimetoprim y vancomicina (Figura 6), los altos valores de resistencia observados indicarían que se trata de resistencia intrínseca o natural que posee por lo tanto un riesgo mínimo de ser transmitida de manera horizontal. Sin embargo, se requieren estudios específicos que confirmen la naturaleza genética de la resistencia observada y el potencial que podrían tener las BAL aisladas como probiótico en la industria alimentaria.

Del análisis de las pruebas fenotípicas, las BAL aisladas formaron tres grupos denominados: A, B, C (Tabla 3). Los grupos se diferenciaron básicamente por la morfología celular, tipo de metabolismo, patrones de fermentación de carbohidratos, crecimiento en NaCl 10 % y sensibilidad a novobiocina, bacitracina y penicilina.

4.2.3. De la caracterización molecular

La caracterización molecular de las 39 BAL aisladas se realizó mediante las técnicas: ARDRA, RISA y rep-PCR y su identificación mediante el secuenciamiento de los genes ribosómicos 16S y la amplificación del gen *rec*A.

La técnica del ARDRA ha sido utilizada en la identificación de especies de BAL pertenecientes a diversos géneros entre ellos: *Lactobacillus*, *Lactococcus, Pediococcus*, *Enterococcus, Weissella, Leuconostoc, Oenococcus* procedentes de diferentes orígenes (Jang et al., 2002; Kšicová et al., 2013; Nisiotou et al., 2015; Rodas et al., 2003; Soto et al., 2010). Tiene la ventaja de ser una técnica sencilla, rápida, reproducible, permite el análisis simultáneo de una gran cantidad de muestras en corto tiempo; su poder de discriminación depende de las enzimas de restricción usadas las cuales pueden ser seleccionadas mediante análisis *in silico* de secuencias de genes ribosómicos 16S depositadas en la base de datos del GenBank (Dec et al., 2016; Soto et al., 2010).

En el presente estudio, las BAL aisladas fueron caracterizadas mediante ARDRA utilizando las enzimas de restricción: *Alu*I, *Mse*I y *Hae*III (Figuras 10, 11 y 12). Las 39 BAL se dividieron en tres grupos usando *Mse*I y *Hae*III, mientras que con *Alu*I se observaron cuatro (Tabla 4). En consecuencia, esta enzima permitió la diferenciación de los aislados BAL11, BAL12, BAL13, BAL14 y BAL33 del aislado BAL10 demostrando tener mayor poder de discriminación que *Mse*I y *Hae*III,

La secuencia de los genes ribosómicos 16S es muy conservada y algunas veces no permite la diferenciación entre especies muy cercanas taxonómicamente. En la mayoría de procariotas, los genes ribosómicos forman el operón *rrn* en el cual los genes se organizan en el siguiente orden: 5’ - 16S - 23S - 5S -3’ y se encuentran separados por dos regiones espaciadoras intergénicas (ITS) que pueden contener genes de ARNt. La región ITS entre los genes 16S y 23S, a diferencia de los genes ribosómicos, presenta gran variabilidad genética en longitud y secuencia constituyendo una herramienta importante para el desarrollo

de métodos de genotipificación bacteriana a nivel de especie como, por ejemplo, la técnica RISA (Kabadjova, Dousset, Le Cam, & Prevost, 2002). Esta técnica utiliza enzimas de restricción para digerir el segmento intergénico amplificado dando lugar a perfiles genéticos que, para el caso de las BAL, han permitido la diferenciación de especies de los géneros *Pediococcus, Enterococcus, Leuconostoc, Lactobacillus, Carnobacterium y Weissella* (Davati et al., 2015; Rachman et al., 2004; Rachman et al., 2003).

En el presente estudio, los perfiles generados a través de la técnica de RISA (Figuras 13 y 14) permitieron organizar a los 39 aislados de BAL en cuatro grupos (Tabla 4) similares a los formados con ARDRA, lo cual confirma la presencia de por lo menos cuatro especies de BAL y el poder discriminatorio de la técnica. Estos resultados son coherentes teniendo en cuenta que ARDRA y RISA permiten la identificación de especies bacterianas (Zeng et al., 2013) y concuerdan con lo reportado por Jeyaram, Romi, Singh, Devi, & Devi (2010) quienes utilizando ambas técnicas obtuvieron el mismo número de perfiles de restricción para especies de BAL de los géneros *Carnobacterium, Lactobacillus* y *Enterococcus* aisladas de fermentados de raíz de bambú.

Diversas especies de *Lactobacillus* han sido diferenciadas mediante RISA. Así, Belfiore et al. (2013) aplicaron la técnica para identificar *L. sakei* y *L. curvatus* utilizando la enzima *Taq*1. A la vez, Moreira et al. (2005) identificaron más de 15 especies de *Lactobacillus* entre las que se encuentran *L. plantarum, L. acidophilus, L. delbrueckii, L. brevis, L. rhamnosus, L. fermentum, L. casei* entre otras, utilizando 11 enzimas de restricción. De la misma manera, Zavaleta et al. (1996) utilizaron esta técnica para diferenciar *W. hellenica, W. paramesenteroides, W. confusa, W. kandleri, W. minor* y *W. viridescens.*

Es importante tener en cuenta que el éxito de las técnicas RISA y ARDRA radica en la selección adecuada de las enzimas para la digestión del segmento amplificado. Por ejemplo, Rachman et al. (2003) demostraron que la digestión del segmento ITS 16S-23S utilizando la enzima *Hind*III no fue suficiente para

diferenciar *L. sakei, L. curvatus, L. farciminis, L. alimentarius, L. plantarum y L. paraplantarum*. Sin embargo, el uso de *Taq*I les permitió obtener diferentes perfiles genéticos que diferenciaron a la mayoría de estas especies excepto *L. plantarum* y *L. paraplantarum*.

Como se ha mencionado, las técnicas ARDRA y RISA han sido utilizadas para determinar la diversidad interespecífica de BAL; sin embargo, es difícil detectar la variabilidad intraespecífica cuando las cepas son filogenéticamente muy cercanas. Así, de las Rivas et al. (2006) no encontraron diferencias entre 16 cepas de *L. plantarum* analizadas mediante RISA, mientras que utilizando la técnica MLST (multilocus sequence typing) tipificaron cepas de una misma especie y demostraron la existencia de variabilidad intraespecífica. En este sentido, se han descrito diversas técnicas basadas en la PCR que permiten la caracterización de aislados a nivel de cepa, una de ellas es la rep-PCR.

La rep-PCR se basa en determinar secuencias de ADN repetitivas y dispersas en los cromosomas bacterianos, una de ellas es el politrinucleótido $(GTG)_5$, secuencia no codante altamente repetida en el genoma de diversas bacterias. La presencia de este tipo de elementos repetidos permite el diseño de cebadores complementarios a estos dando como resultado la amplificación de fragmentos de ADN de diferentes tamaños ubicados a ambos lados de las secuencias repetidas y que al ser separados mediante electroforesis permiten obtener patrones de bandas característicos de cada clon bacteriano (Versalovic et al., 1994). La técnica ha sido útil para la caracterización de diferentes especies bacterianas y de levaduras (Adimpong et al., 2012; Akabanda et al., 2013; Owusu-Kwarteng et al., 2012) y ha demostrado tener gran reproducibilidad (De Vuyst et al., 2008; Gevers et al., 2001).

Utilizando la técnica rep-PCR con el cebador GTG_5 fue posible obtener diferentes patrones de bandas (Figuras 15 y 16) demostrando que entre las BAL existe mayor diversidad que la observada mediante ARDRA y RISA (Tabla 4). Los 14 patrones obtenidos corresponden a 14 genotipos o cepas lo cual demuestra

la existencia de diversidad intraespecífica en las BAL aisladas. Estos resultados son similares a los reportados por Silva et al. (2017) quienes utilizando la técnica RISA y el secuenciamiento de los genes ribosómicos 16S identificaron seis especies de BAL a partir de 33 aislados; pero, al usar rep-PCR con el cebador GTG_5 observaron 18 genotipos. De manera similar, Kingston et al. (2010) mediante ARDRA observaron perfiles similares para 16 aislados de BAL identificados como *L. paraplantarum y L. pentosus*, pero cuando utilizaron rep-PCR encontraron 8 genotipos, demostrando la existencia de variabilidad intraespecífica.

En la Tabla 4, se observa que existen ocho genotipos con el perfil I y cuatro con el perfil III, mientras que entre los aislados con los perfiles II y IV no se observó diversidad intraespecífica. El mayor número de genotipos de BAL fueron aislados de guayaba, ungurahui y pijuayo. Las BAL con el genotipo 1.1. fueron aisladas en ocho de los 11 frutos investigados, la imposición de una cepa en la superficie de estos frutos puede ser atribuida a la producción de compuestos antagonistas que limitan la sobrevivencia de otras cepas (Hibbing et al., 2010).

Muchas cualidades biotecnológicas de las BAL como la producción de sustancias antimicrobianas, compuestos aromáticos y la capacidad probiótica son dependientes de cepa (Cheong et al., 2014; Mohania et al., 2008; Kun Lee & Salminem, 2009). Por ello, la caracterización de los aislados permite determinar ciertas particularidades en las cepas para su mejor aprovechamiento en procesos biotecnológicos.

En base a las características fenotípicas y los perfiles de restricción detectados mediante ARDRA, RISA y rep-PCR se seleccionaron los aislados representativos de cada perfil (Tabla 4) y se realizó el secuenciamiento de los genes ribosómicos 16S para su identificación. El análisis de las secuencias nucleotídicas indica la presencia de *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Weissella cibaria* y *Weissella confusa* con una similitud mayor al 99,9 % (Tabla 5). Estas 4 especies se relacionan con los cuatro grupos de BAL obtenidos

por las técnicas ARDRA y RISA. Sin embargo, debido a que *L. plantarum, L. paraplantarum* y *L. pentosus* poseen una similitud mayor a 99 % en la secuencia de los genes ribosómicos 16S (Agaliya & Jeevaratnam, 2013; Torriani et al., 2001), se utilizó una técnica de PCR específica basada en el gen *rec*A y descrita por Torriani et al. (2001) para confirmar la identidad de los aislados de *L. plantarum*. El gen *rec*A codifica la proteína RecA implicada en procesos de reparación y síntesis del ADN jugando un rol fundamental en la célula, su amplificación mediante PCR múltiple utilizando cebadores específicos permite diferenciar *L. paraplantarum, L. plantarum* y *L. pentosus* teniendo en cuenta la longitud de los amplificados de: 107 pb, 318 pb y 218 pb, respectivamente. Después de analizar los productos amplificados del gen *rec*A (Figura 18), se confirmó que los 30 aislados pertenecientes al grupo I pertenecen a *L. plantarum.*

El árbol filogenético construido con la información de las secuencias de los genes ribosómicos 16S separó las BAL aisladas en dos grandes grupos, uno corresponde al género *Lactobacillus* y el otro a *Weissella*, los valores altos de bootstrap apoyan estas agrupaciones. Al interior de cada uno de los dos grupos formados existe una bifurcación; por un lado *L. plantarum* y *L. brevis* y por otro *W. confusa* y *W. cibaria* (Figura 17). Para la elaboración del árbol filogenético se incluyeron secuencias de *Lactobacillus paraplantarum* y *L. pentosus* debido a la alta similitud con *L. plantarum* (Torriani et al., 2001). Así, en el árbol filogenético se observa que las tres especies se ubican en el mismo grupo filogenético, lo cual concuerda con lo señalado por Ennahar et al. (2003), en el sentido que *L. plantarum y L. pentosus* difieren tan solo en 2 pb en la secuencia de sus genes ribosómicos.

Lactobacillus es uno de los géneros de BAL frecuentemente aislado a partir de muestras de vegetales frescos o fermentados (Doulgeraki et al., 2013; Oyedeji et al., 2013; Ludwig et al., 2009). Cabe destacar que *Lactobacillus plantarum* es una de las más de 200 especies del género *Lactobacillus*, conocida por su gran versatilidad metabólica y gran tamaño de su genoma, su amplia distribución y adaptación a diversas condiciones ambientales (Kleerebezem et al., 2003; Pisano

et al., 2010; Siezen & van Hylckama Vlieg, 2011). *L. plantarum* fermenta diferentes carbohidratos y pertenece al grupo de los heterofermentativos facultativos, presenta gran tolerancia a condiciones de acidez, pudiendo desarrollar en ambientes a pH menores de 4 (Ludwig et al., 2009), características que concuerdan con los resultados obtenidos en las pruebas fenotípicas (Tabla 3). Estas características explican la presencia de *L. plantarum* en las etapas avanzadas de muchos procesos fermentativos donde las condiciones de acidez limitan el desarrollo de otros microorganismos. Asimismo, soporta la acidez del tracto gastrointestinal, cualidad por la cual esta especie es considerada como probiótica.

Por otro lado, *L. plantarum* es conocido por su variabilidad genética (Pisano et al., 2010); así, mediante el análisis rep-PCR se obtuvieron ocho genotipos en los 30 aislados de esta especie. La gran diversidad intraespecífica de *L. plantarum* está relacionada a la existencia de islas genómicas compuestas de agrupaciones de genes destinados para la utilización de carbohidratos, que pueden ser adquiridos, combinados, sustituidos o suprimidos en respuesta a los requerimientos del medio. La gran flexibilidad de estas agrupaciones funcionales favorece la versatilidad de *L. plantarum* a diferentes sustratos y cambios ambientales. Por esta razón, Siezen & van Hylckama Vlieg, (2011) consideran a *L. plantarum* un "ingeniero metabólico natural".

El secuenciamiento de los genes ribosómicos 16S determinó que los aislados BAL38, BAL39 y BAL9 pertenecen a *Lactobacillus brevis,* los cuales a diferencia de *L. plantarum* se caracterizan por su metabolismo heterofermentativo obligado; en relación a esta y otras características evaluadas en las pruebas fenotípicas realizadas, los resultados obtenidos fueron concordantes con la mayoría de las características descritas para esta especie (Ludwig et al., 2009; Carr et al., 2002) a excepción de la fermentación de maltosa y el crecimiento a 45 °C, pruebas en las que se obtuvieron resultados opuestos a los reportados en ambas publicaciones. *L. brevis,* al igual que *L. plantarum*, es reconocida por su capacidad probiótica (Kun Lee & Salminem, 2009; Ramos et

al., 2013), por lo cual el aislamiento de ambas especies constituye una oportunidad para evaluar su potencial uso en el campo de los alimentos funcionales.

Según la secuencia de los genes ribosómicos 16S, los aislados BAL10, BAL11, BAL12, BAL13, BAL14 y BAL33 pertenecen a *W. cibaria y W. confusa.* Según Fusco et al. (2015) ambas especies son heterofermentativas obligadas y comparten varias características fenotípicas adicionales pero difieren en el perfil de fermentación de galactosa; así, *W. confusa* fermenta este carbohidrato, pero no *W. cibaria* (Tabla 3). A pesar de su cercanía filogenética, ambas especies fueron discriminadas mediante los perfiles de restricción obtenidos mediante ARDRA (*Alu*I) y RISA. Algunas especies del género *Weissella,* al igual que *Lactobacillus,* están involucradas en la fermentación de alimentos tradicionales y otras han recibido atención por su capacidad probiótica; especialmente *W. cibaria* que posee un gran potencial probiótico para controlar la enfermedad periodontal y otras propiedades biotecnológicas como la producción de polisacáridos extracelulares (Fusco et al.,2015).

4.2.4. Del potencial biotecnológico

Además de las pruebas fenotípicas y la caracterización molecular de las BAL aisladas, se realizaron tres ensayos adicionales con la finalidad de evaluar su potencial biotecnológico para la producción de exopolisacáridos (EPS) y ácido láctico.

La producción de EPS por las BAL aisladas fue evaluada cualitativamente usando como fuentes de carbono: glucosa, maltosa, fructosa y sacarosa. Se observó la producción de EPS solo en presencia de sacarosa por *W. confusa* BAL10, cepas de *W. cibaria* BAL11, BAL12, BAL13, BAL14, BAL33 y *L. plantarum* BAL19 y BAL20 (Tabla 3, Figura 19). Al respecto, Bounaix et al., (2009) demostraron la producción de EPS por *W. cibaria y W. confusa* en medio

MRS suplementado con sacarosa. A la vez, Tieking et al. (2003) observaron la producción de EPS en un medio con sacarosa por cepas de *L. reuteri, L. pontis* y *L. frumenti.* Diferentes azúcares han sido evaluados en la producción de EPS y la preferencia por uno u otro azúcar ha sido atribuida a la presencia de diferentes sistemas de transporte de azúcares en las cepas de BAL o a variaciones en la actividad de las enzimas implicadas en la síntesis de precursores de las unidades repetidas que conforman la estructura de los EPS (Chervaux et al., 2000; Mozzi et al., 2001). La síntesis de EPS en las especies de *Weissella* es concordante con lo señalado por Fusco et al. (2015), quienes indican que la producción de este metabolito es una característica fenotípica y biotecnológica de *W. confusa* y *W. cibaria*, ambas son productoras de oligosacáridos y EPS del tipo dextrano y fructano con potencial aplicación como prebióticos en alimentos funcionales. De igual manera, la producción de EPS por *L. plantarum* ha sido reportada en diferentes investigaciones en las cuales se resalta su aporte en la mejora de las características reológicas de ciertos alimentos (Ismail & Nampoothiri, 2014; Wang et al., 2015).

Referente a la **producción de ácido láctico** (Figura 20), las BAL aisladas forman dos grupos: uno conformado por 30 aislados de *L. plantarum* que produjeron entre 20 a 23 g/L y el otro conformado por tres aislados de *L. brevis* y seis de *Weissella* que produjeron entre 12 a 17 g/L de este compuesto. Esta diferencia es explicable si se tiene en cuenta el tipo de metabolismo de las BAL, aquellas que poseen metabolismo homofermentativo como *L. plantarum,* utilizan la vía glicolítica y producen 2 moles de ácido láctico a partir de 1 mol de glucosa, mientras que las BAL con metabolismo heterofermentativo obligado como *L. brevis, W. cibaria* y *W. confusa* usan la vía de la fosfocetolasa para fermentar 1 mol de glucosa produciendo menor cantidad de ácido láctico (1 mol) y otros productos como CO_2 y ácido acético/etanol (Endo & Dicks, 2014). Los 30 aislados de *L. plantarum*, son candidatos para la producción de ácido láctico debido a que siendo homofermentativos generan este compuesto como único producto en la fermentación de las hexosas facilitando así su separación y evitando procesos de purificación posteriores. Los altos rendimientos de ácido

láctico obtenidos, en todos los casos superiores al 100 %, indican el potencial que tendrían estas cepas para futuros procesos biotecnológicos. En este sentido, el año 2017 se realizó la optimización de la producción de ácido láctico utilizando la cepa BAL24 y un medio de cultivo en base a melaza de caña, obteniéndose un rendimiento superior al 90 % lo cual confirma la utilidad de las cepas de *Lactobacillus plantarum* en la producción de ácido láctico (Saavedra, 2017). Otras investigaciones también han reportado el uso de *L. plantarum* en la producción de ácido láctico a partir de sustratos residuales (Coelho et al., 2011; Fu & Mathews, 1999). El ácido láctico es un producto de gran interés en la industria alimentaria, cosmética, médica, farmacéutica. El 85 % de la demanda le corresponde al sector alimentario donde es usado como preservante, acidulante y saborizante. Asimismo, en la industria química existe un creciente interés por el ácido láctico como monómero para la producción de ácido poliláctico (bioplástico) y solventes "verdes" (ésteres de lactato) que reemplacen a los productos derivados de la industria petroquímica. (Ghaffar et al., 2014; Sheeladevi & Ramanathan, 2012).

Por estequiometría el rendimiento teórico de ácido láctico a partir de glucosa para una cepa homofermentativa es 100 %, los rendimientos obtenidos superiores a este valor se explican en razón de la presencia de fuentes de carbono adicionales a la glucosa (citrato de amonio, acetato de sodio) en el caldo MRS utilizado como medio de cultivo.

Respecto a las cepas *L. brevis* y ambas especies de *Weissella* se debe tener en cuenta que si bien la acidez titulable se ha expresado como ácido láctico, debido al metabolismo heterofermentativo de estas cepas, la acidez en el medio de cultivo no sólo se debe a la producción de ácido láctico sino también a la producción de otros ácidos orgánicos como el ácido acético.

En la presente investigación se caracterizaron 39 BAL aisladas de diversos frutos de la Región Loreto utilizando técnicas moleculares y fenotípicas que permitieron obtener información complementaria para conocer la diversidad

genética y la fisiología de las cepas aisladas. Por lo tanto, se sugiere profundizar el estudio de las cepas de BAL aisladas para determinar su aplicación en futuros procesos biotecnológicos que permitan su aprovechamiento. Con ese fin se sugiere:

Para las cepas de *Lactobacillus plantarum*, se realicen pruebas de fermentación para determinar cuantitativamente y con mayor precisión el rendimiento y la productividad volumétrica de ácido láctico, se determine el tipo de isómero de ácido láctico que producen, se evaluen sustratos económicos que sean útiles como fuente de carbono para la producción de ácido láctico, se optimize la producción de ácido láctico evaluando las distintas variables que influyen en el proceso y se determine el potencial de las cepas como probiótico.

En cuanto a las cepas productoras de exopolisacáridos, se recomienda realizar la caracterización del EPS producido para determinar su composición química y la utilidad del mismo, determinar de manera cuantitativa el rendimiento y productividad volumétrica de EPS y optimizar la producción de EPS evaluando las distintas variables que influyen en el proceso.

CAPITULO V. CONCLUSIONES

1. Se aislaron y seleccionaron 39 BAL a partir de 14 frutos procedentes de la región Loreto.

2. Fenotípicamente, las 39 BAL se clasificaron en tres grupos teniendo en cuenta su morfología celular, tipo de metabolismo, patrones de fermentación de carbohidratos, crecimiento en NaCl 10 % y sensibilidad a novobiocina, bacitracina y penicilina.

3. La caracterización molecular de las 39 BAL mediante ARDRA y RISA permitió obtener cuatro perfiles genéticos, mientras que mediante la técnica de rep-PCR se evidenció diversidad intraespecífica detectándose 14 perfiles.

4. La secuenciación de los genes ribosómicos 16S permitió la identificación de las BAL: 30 aislados pertenecen a *Lactobacillus plantarum*, tres a *Lactobacillus brevis*, cinco a *Weissella cibaria* y uno a *Weissella confusa*.

5. Las BAL aisladas de frutos de la Región Loreto producen ácido láctico y exopolisacáridos, metabolitos con gran potencial biotecnológico.

CAPITULO VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abriouel, H., Casado, M. del C., Lavilla, L., Pérez, B., Bockelmann, W., Pichner, R., & Benomar, N. (2015). New insights in antibiotic resistance of *Lactobacillus* species from fermented foods. Food Research International, 78, 465–481.

Adiguzel, G. C., & Atasever, M. (2009). Phenotypic and genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from Turkish dry fermented sausage. Romanian Biotechnological Letters, 14(1), 4130–4138.

Adimpong, D. B., Nielsen, D. S., Sørensen, K. I., Derkx, P. M., & Jespersen, L. (2012). Genotypic characterization and safety assessment of lactic acid bacteria from indigenous African fermented food products. BMC Microbiology, 12(1), 75.

Agaliya, P. J., & Jeevaratnam, K. (2013). Molecular characterization of lactobacilli isolated from fermented idli batter. Brazilian Journal of Microbiology, 44(4), 1199–1206.

Agarwal, M., Garg, F. C., & Negi, Y. K. (2014). Antibiotic resistance and plasmid profile of *Leuconostoc spp*. isolated from carrot. Journal of Bacteriology Research, 6(1), 7–12.

Akabanda, F., Owusu-Kwarteng, J., Tano-Debrah, K., Glover, R. L. K., Nielsen, D. S., & Jespersen, L. (2013). Taxonomic and molecular characterization of lactic acid bacteria and yeasts in nunu, a Ghanaian fermented milk product. Food Microbiology, 34(2), 277–283.

Akpinar, A., Yerlikaya, O., & Kiliç, S. (2011). Antimicrobial activity and antibiotic resistance of *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* strains isolated from Turkish homemade yoghurts. African Journal of Microbiology Research, 5(6), 675–682.

Ammor, M. S., Flórez, A. B., & Mayo, B. (2007). Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. Food Microbiology, 24(6), 559–570.

Amorocho, C. M. (2011). Caracterización y potencial probiótico de bacterias lácticas aisladas de leche de oveja Guirra. (Tesis doctoral). Universidad Politécnica de Valencia. España.

Axelsson, L., & Lindgren, S. (1987). Characterization and DNA homology of *Lactobacillus* strains isolated from pig intestine. The Journal of applied bacteriology 62(5):433-40

Axelsson, L., & Ahrné, S. (2000). Food and medicine. Applied Microbial Systematics, 367–388.

Azevêdo, J. C. S., Borges, K.C., Genovese, M. I., Correia, R. T. P., & Vattem, D. A. (2015). Neuroprotective effects of dried camu-camu (*Myrciaria dubia* HBK McVaugh) residue in *C. elegans*. Food Research International. 73:135–141.

Bae, S., Fleet, G. H., & Heard, G. M. (2006). Lactic acid bacteria associated with wine grapes from several Australian vineyards. Journal of Applied Microbiology, 100(4), 712–727.

Banwo, K., Sanni, A., Tan, H., & Tian, Y. (2012). Phenotypic and genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from some Nigerian traditional fermented foods. Food Biotechnology, 26(1), 124–142.

Bart, M., Hankinson, T. R., Zhuang, H., & Breidt, F. (2009). Microbiological Spoilage of Fruits and Vegetables. En Sperber, W. H., Doyle, M. P. (eds.), Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages, Food Microbiology and Food Safety (pp. 135-183). New York. Springer Science+Business Media.

Barrera, J.A., & Hernández MS. (2004). Bases técnicas para el aprovechamiento agroindustrial de las especies nativas de la amazonia. Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas SINCHI. Bogotá - Colombia. Editora Guadalupe Ltda. 102 p.

Belfiore, C., Raya, R. R., & Vignolo, G. M. (2013). Identification, technological and safety characterization of *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus curvatus* isolated from Argentinean anchovies (*Engraulis anchoita*). SpringerPlus, 2(1), 257.

Ben Amor, K., Vaughan, E. E., & de Vos, W. M. (2007). Advanced molecular tools for the identification of lactic acid bacteria. J Nutr, 137(3 Suppl 2), 741S–7S.

Bernardeau, M., Vernoux, J. P., Henri-Dubernet, S., & Guéguen, M. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. International Journal of Food Microbiology, 126(3), 278–285.

Bounaix, M. S., Gabriel, V., Morel, S., Robert, H., Rabier, P., Remaud-Siméon, M., & Fontagné-Faucher, C. (2009). Biodiversity of exopolysaccharides produced from sucrose by sourdough lactic acid bacteria. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57(22), 10889–10897.

Carr, F. J., Chill, D., & Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: A literature survey. Critical Reviews in Microbiology, 28(4), 281–370.

Chambel, L., Chelo, I. M., Zé-Zé, L., Pedro, L. G., Santos, M. A., & Tenreiro, R. (2006). *Leuconostoc pseudoficulneum* sp. nov., isolated from a ripe fig. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 56(6), 1375–1381.

Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L., & Collins, J. K. (1998). Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus species*. Journal of Food Protection, 61(12), 1636–1643.

Chen, Y. S., Wu, H. C., & Yanagida, F. (2010). Isolation and characteristics of lactic acid bacteria isolated from ripe mulberries in Taiwan. Brazilian Journal of Microbiology, 41(4), 916–921.

Cheong, E. Y. L., Sandhu, A., Jayabalan, J., Kieu Le, T. T., Nhiep, N. T., My Ho, H. T., & Turner, M. S. (2014). Isolation of lactic acid bacteria with antifungal activity against the common cheese spoilage mould *Penicillium commune* and their potential as biopreservatives in cheese. Food Control, 46, 91–97.

Chervaux, C., Ehrlich, S. D., & Maguin, E. (2000). Physiological Study of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* strains in a Novel Chemically Defined Medium. Applied and Environmental Microbiology 66(12), 5306–5311.

Coelho, L. F., De Lima, C. J. B., Rodovalho, C. M., Bernardo, M. P., & Contiero, J. (2011). Lactic acid production by new *Lactobacillus plantarum* LMISM6 grown in molasses:

Optimization of medium composition. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 28(1), 27–36.

Collado Amores, M. C. (2004). Caracterizacion de cepas del género *Bifidobacterium* con caracter probiótico. (Tesis). Universidad Politécnica de Valencia. Departamento de Biotecnologia, 1–283.

Coppola, R., Succi, M., Tremonte, P., Reale, A., Salzano, G., & Sorrentino, E. (2005). Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. Le Lait, INRA Editions, 85(3), 193–204.

Cotter, P.D, Hill, C., & Ross, R.P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. Nature Reviews Microbiology 3:777–88.

Cotter, P. D., Ross, R. P., & Hill, C. (2013). Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? Nature Reviews Microbiology, 11(2), 95–105.

D'Aimmo, M. R., Modesto, M., & Biavati, B. (2007). Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium spp.* isolated from dairy and pharmaceutical products. International Journal of Food Microbiology, 115(1), 35–42.

Davati, N., Yazdi, F. T., Zibaee, S., Shahidi, F., & Edalatian, M. R. (2015). Study of lactic acid bacteria community from raw milk of Iranian one humped camel and evaluation of their probiotic properties. Jundishapur Journal of Microbiology, 8(5), 1–6.

Dec, M., Puchalski, A., Urban-Chmiel, R., & Wernicki, A. (2016). 16S-ARDRA and MALDI-TOF mass spectrometry as tools for identification of Lactobacillus bacteria isolated from poultry. BMC Microbiology, 16, 105.

de las Rivas, B., Marcobal, Á.′, & Muñoz, R. (2006). Development of a multilocus sequence typing method for analysis of *Lactobacillus plantarum* strains. Microbiology, 152(1), 85–93.

De Vuyst, L., Camu, N., De Winter, T., Vandemeulebroecke, K., Van de Perre, V., Vancanneyt, M., & Cleenwerck, I. (2008). Validation of the (GTG)5-rep-PCR fingerprinting technique for rapid classification and identification of acetic acid

bacteria, with a focus on isolates from Ghanaian fermented cocoa beans. International Journal of Food Microbiology, 125(1), 79–90.

Díaz-Ruiz, G., Guyot, J. P., Ruiz-Teran, F., Morlon-Guyot, J., & Wacher, C. (2003). Microbial and physiological characterization of weakly amylolytic but fast-growing lactic acid bacteria: A functional role in supporting microbial diversity in pozol, a Mexican fermented maize beverage. Applied and Environmental Microbiology, 69(8), 4367–4374.

Di Cagno, R., Cardinali, G., Minervini, G., Antonielli, L., Rizzello, C. G., Ricciuti, P., & Gobbetti, M. (2010). Taxonomic structure of the yeasts and lactic acid bacteria microbiota of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) and use of autochthonous starters for minimally processing. Food Microbiology, 27(3), 381–389.

Doulgeraki, A. I., Pramateftaki, P., Argyri, A. a., Nychas, G. J. E., Tassou, C. C., & Panagou, E. Z. (2013). Molecular characterization of lactic acid bacteria isolated from industrially fermented Greek table olives. LWT - Food Science and Technology, 50(1), 353–356.

Du Toit, M., Dicks, L. M. T., & Holzapfel, W. H. (2001). Taxonomy of obligately homofermentative and facultatively heterofermentative lactobacilli in pig faeces. Letters in Applied Microbiology, 32(3), 199–204.

Dubernet, S., Desmasures, N., & Guéguen, M. (2002). A PCR-based method for identication of lactobacilli at the genus level. FEMS Microbiology Letters, 214, 271–275.

Edwards, U., Rogall, T., Blöcker, H., Emde, M., & Böttger, E. C. (1989). Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. Nucleic Acids Research, 17(19), 7843–7853.

European Food Safety Authority. (2012). Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. EFSA Journal, 10(6): 2740.

Emerenini, E. C., Afolabi, O. R., Okolie, P. I., & Akintokun, a K. (2013). Isolation and Molecular Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from Fresh Fruits and

Vegetables Using Nested PCR Analysis. British Microbiology Research Journal, 3(3), 368–377.

Endo, A., & Dicks, L. (2014) Physiology of the LAB. En Holzapfel, W., & Wood, B. (eds), Lactic Acid Bacteria. Biodiversity and Taxonomy (pp. 13-30). UK. John Wiley & Sons, Ltd.

Ennahar, S., Cai, Y., & Fujita, Y. (2003). Phylogenetic Diversity of Lactic Acid Bacteria Associated with Paddy Rice Silage as Determined by 16S Ribosomal DNA Analysis Phylogenetic Diversity of Lactic Acid Bacteria Associated with Paddy Rice Silage as Determined by 16S Ribosomal DNA Analysis. Applied and Environmental Microbiology, 69(1), 444–451.

Ferrer, M., Beloqui, A., Timmis, K. N., & Golyshin, P. N. (2008). Metagenomics for mining new genetic resources of microbial communities. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 16(1–2), 109–123.

Fhoula, I., Najjari, A., Turki, Y., Jaballah, S., Boudabous, A., & Ouzari, H. (2013). Diversity and antimicrobial properties of lactic acid bacteria isolated from rhizosphere of olive trees and desert truffles of tunisia. BioMed Research International, 2013.

Flórez, A. B., Campedelli, I., Delgado, S., Alegría, Á., Salvetti, E., Felis, G. E., & Torriani, S. (2016). Antibiotic susceptibility profiles of dairy leuconostoc, analysis of the genetic basis of atypical resistances and transfer of genes in vitro and in a food matrix. PLoS ONE, 11(1), 1–21.

Fu, W., & Mathews, A. P. (1999). Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum:* kinetic model and effects of pH, substrate, and oxygen. Biochemical Engineering Journal, 3(3), 163–170.

Fusco, V., Quero, G. M., Cho, G. S., Kabisch, J., Meske, D., Neve, H., & Franz, C. M. A. P. (2015). The genus *Weissella*: Taxonomy, ecology and biotechnological potential. Frontiers in Microbiology, 6(MAR).

Gad, G. F. M., Abdel-Hamid, A. M., & Farag, Z. S. H. (2014). Antibiotic resistance in lactic acid bacteria isolated from some pharmaceutical and dairy products. Brazilian Journal of Microbiology: 45(1), 25–33.

Gevers, D., Huys, G., & Swings, J. (2001). Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of Lactobacillus species. FEMS Microbiology Letters, 205, 31–36.

Ghaffar, T., Irshad, M., Anwar, Z., Aqil, T., Zulifqar, Z., Tariq, A., & Mehmood, S. (2014). Recent trends in lactic acid biotechnology: A brief review on production to purification. Journal of Radiation Research and Applied Sciences, 7(2), 222–229.

Giusto, C., Medrala, D., Comi, G., & Manzano, M. (2007). Application of PCR-DGGE for the identification of lactic acid bacteria in active dry wine yeasts. Ann Microbiol 57:137

Gomes, F. C. O., Silva, C. L. C., Vianna, C. R., Lacerda, I. C. A., Borelli, B. M., Nunes, Á. C., & Rosa, C. A. (2010). Identification of lactic acid bacteria associated with traditional cachaça fermentations. Brazilian Journal of Microbiology, 41(2), 486–492.

Gonzales, A. (2007). Frutales nativos amazónicos. Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana. Iquitos. Perú.

Han, J., Chen, D., Li, S., Li, X., Zhou, W.-W., Zhang, B., & Jia, Y. (2015). Antibiotic Susceptibility of Potentially Probiotic *Lactobacillus* Strains. Italian Journal of Food Sciences, 27, 282–289.

Hattingh, M., Alexander, A., Meijering, I., Van, R. C. A., & Dicks, L. M. T. (2015). Amylolytic strains of *Lactobacillus plantarum* isolated from barley. African Journal of Biotechnology, 14(4), 310–318.

Hibbing, M. E., Fuqua, C., Parsek, M.R., & Peterson, S.B. (2010). Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. Nature Reviews in Microbiology 8(1):15–25.

Holzapfel, W. H., & Wood, B. J. (2014). Introduccion to the BAL. En Holzapfel, W. H., & Wood, B. J. B. En Lactic Acid Bacteria Biodiversity and Taxanomy (pp 1-12). UK: John Wiley & Sons, Ltd.

Horner-Devine, M. C., Carney, K. M., & Bohannan, B. J. M. (2004). An ecological perspective on bacterial biodiversity. Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society, 271(1535), 113–122.

Ismail, B., & Nampoothiri, K. M. (2014). Molecular characterization of an exopolysaccharide from a probiotic *Lactobacillus plantarum* MTCC 9510 and its efficacy to improve the texture of starchy food. Journal of Food Science and Technology, 51(12), 4012–4018.

Jang, J., Kim, B., Lee, J., Kim, J., Jeong, G., & Han, H. (2002). Identification of *Weissella* species by the genus-species amplified ribosomal DNA restriction analysis. FEMS Microbiology Letters, 212, 29–34.

Jeyaram, K., Romi, W., Singh, T. A., Devi, A. R., & Devi, S. S. (2010). Bacterial species associated with traditional starter cultures used for fermented bamboo shoot production in Manipur state of India. International Journal of Food Microbiology, 143(1), 1–8.

Jini, R., Swapna, H. C., Rai, A. K., Vrinda, R., Halami, P. M., Sachindra, N. M., & Bhaskar, N. (2011). Isolation and characterization of potential lactic acid bacteria (LAB) from freshwater fish processing wastes for application in fermentative utilisation of fish processing waste. Brazilian Journal of Microbiology, 42(4), 1516–1525.

Kabadjova, P., Dousset, X., Le Cam, V., & Prevost, H. (2002). Differentiation of closely related *Carnobacterium* food isolates based on 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacer region polymorphism. Applied and Environmental Microbiology, 68(11), 5358–5366.

Katla, A. K., Kruse, H., Johnsen, G., & Herikstad, H. (2001). Antimicrobial susceptibility of starter culture bacteria used in Norwegian dairy products. International Journal of Food Microbiology, 67(1–2), 147–152.

Kelly, W. J., Ward, L. J. H., & Leahy, S. C. (2010). Chromosomal diversity in *Lactococcus lactis* and the origin of dairy starter cultures. Genome Biology and Evolution, 2(1), 729–744.

Kingston, J. J., Radhika, M., Roshini, P. T., Raksha, M. A., Murali, H. S., & Batra, H. V. (2010). Molecular characterization of lactic acid bacteria recovered from natural fermentation of beet root and carrot Kanji. Indian Journal of Microbiology, 50(3), 292–298.

Kıvanç, M., & Yapıcı, E. (2015). Kefir as a Probiotic Dairy Beverage: Determination Lactic Acid Bacteria and Yeast. ETP International Journal of Food Engineering, 1(1), 55–60.

Kleerebezem, M., Boekhorst, J., van Kranenburg, R., Molenaar, D., Kuipers, O. P., Leer, R., & Siezen, R. J. (2003). Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 100(4), 1990–5.

Kleynmans, U., Heinzl, H., & Hammes, W. P. (1989). *Lactobacillus suebicus* sp. nov., an obligately heterofermentative *Lactobacillus* species isolated from fruit mashes. Systematic and Applied Microbiology 11: 267–271.

König, H., & Fröhlich, J. (2009). Lactic acid bacteria. Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine, 3–29.

Kšicová, K., Dušková, M., & Karpíšková, R. (2013). Differentiation of *Lactobacillus* Species by ARDRA. Czech Journal of Food Sciences, 31(2), 180–188.

Komesu, A., Rocha de Oliveira, J. A., da Silva Martins, L. E., Wolf, M. R., & Filho, R. M. (2017). Lactic acid production to purification: A review. Bioresources 12(2):4364-4383.

Kun Lee, Y., & Salminem, S. (2009). Handbook of probiotics and prebiotics. 2nd ed. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.

Kunene, N. F., Geornaras, I., Von Holy, A., & Hastings, J. W. (2000). Characterization and determination of origin of lactic acid bacteria from a sorghum-based fermented

weaning food by analysis of soluble proteins and amplified fragment length polymorphism fingerprinting. Applied and Environmental Microbiology, 66(3), 1084–1092.

Lee, J.-S., Lee, S.-H., Ahn, M.-J., Ku, H.-J., Hong, J.-S., Jeon, C. O., & Lee, K. C. (2015). *Weissella jogaejeotgali* sp. nov., isolated from jogae jeotgal, a traditional Korean fermented seafood. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 65(12), 4674–4681.

Leff, J. W., & Fierer, N. (2013). Bacterial Communities Associated with the Surfaces of Fresh Fruits and Vegetables. PLoS ONE, 8(3), 1–9.

Liong, M. T., & Shah, N. P. (2005). Production of organic acids from fermentation of mannitol, fructooligosaccharide and inulin by a cholesterol removing *Lactobacillus acidophilus* strain. Journal of Applied Microbiology, 99(4), 783–793.

Liu, W., Bao, Q., Jirimutu, Qing, M., Siriguleng, Chen, X., & Zhang, H. (2012). Isolation and identification of lactic acid bacteria from Tarag in Eastern Inner Mongolia of China by 16S rRNA sequences and DGGE analysis. Microbiological Research, 167(2), 110–115.

Lu, J., Tappel, R. C., & Nomura, C. T. (2009). Mini-Review: Biosynthesis of Poly(hydroxyalkanoates). Polymer Reviews, 49(3), 226–248.

Ludwig, W., Schleifer, K-H., & Whitman, W. B. (2009). Orden II. Lactobacillales. En De Vos, P., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K-H., & Whitman, W. B. (eds), Bergey´s Manual of Systematic Bacteriology. Vol 3. The Firmicutes. 2nd ed. (pp. 464-722). New York. Springer.

Madhavan, N., Nair, N. R., & John, R. P. (2010). An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research. Bioresource Technology, 101:8493–501

Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., & Stahl, D. A. (2015). Brock biology of microorganisms (14th Ed). Pearson Education, Inc.

Maldonado-Barragán, A., Caballero-Guerrero, B., Lucena-Padrós, H., & Ruiz-Barba, J. L. (2013). Induction of bacteriocin production by coculture is widespread among

plantaricin-producing *Lactobacillus plantarum* strains with different regulatory operons. Food Microbiology, 33(1), 40–47.

Mathur, S., & Singh, R. (2005). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria - A review. International Journal of Food Microbiology, 105(3), 281–295.

Mazzoli, R., Bosco, F., Mizrahi, I., Bayer, E. a., & Pessione, E. (2014). Towards lactic acid bacteria-based biorefineries. Biotechnology Advances, 32(7):1216-1236.

Ministerio del Medio Ambiente. (2014). Estrategia nacional de diversidad biológica al 2021 y su plan de acción 2014-2018. Lima. Perú.

Mohania, D., Nagpal, R., Kumar, M., Bhardwaj, A., Yadav, M., Jain, S., & Yadav, H. (2008). Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria. Journal of Digestive Diseases, 9(4), 190–198.

Monedero, V., Pérez-Martínez, G., & Yebra, M. J. (2010). Perspectives of engineering lactic acid bacteria for biotechnological polyol production. Applied Microbiology and Biotechnology, 86(4), 1003–1015.

Moreira, J. L. S., Mota, R. M., Horta, M. F., Teixeira, S. M. R., Neumann, E., Nicoli, J. R., & Nunes, A. C. (2005). Identification to the species level of *Lactobacillus* isolated in probiotic prospecting studies of human, animal or food origin by 16S-23S rRNA restriction profiling. BMC Microbiology, 5, 15.

Moulay, M., Aggad, H., Benmechernene, Z., Guessas, B., Henni, D. E., & Kihal, M. (2006). Cultivable Lactic Acid Bacteria Isolated from Algerian Raw Goat´s Milk and Their Proteolytic Activity. World Journal of Diary & Food Sciences, 1(1), 12–18.

Mozzi, F., Rollán, G., Savoy de Giori, G., & Font de Valdez, G. (2001). Effect of galactose and glucose on the exopolysaccharide production and the activities of biosynthetic enzymes in *Lactobacillus casei* CRL 87, 160–167.

Nassonova, E.S. (2008). Pulsed field gel electrophoresis: Theory, instruments and application. Cell and Tisue Biology, 2: 557.

Neethu, M. J., Bunt, C. R., & Hussain, M. A. (2015). Implications of Antibiotic Resistance in Probiotics. Food Reviews International, 31(1), 52–62.

Ni, K., Wang, Y., Li, D., Cai, Y., & Pang, H. (2015). Characterization, identification and application of lactic acid bacteria isolated from forage paddy rice silage. PLoS ONE, 10(3), 1–14.

Nisiotou, A. A., Dourou, D., Filippousi, M., Fragkoulis, P., Tassou, C., & Banilas, G. (2015). Genetic and technological characterisation of vineyard- and winery- associated lactic acid bacteria, BioMed Research International 2015, 1–23.

Nyanga, L. K., Nout, M. J. R., Gadaga, T. H., Theelen, B., Boekhout, T., & Zwietering, M. H. (2007). Yeasts and lactic acid bacteria microbiota from masau (*Ziziphus mauritiana*) fruits and their fermented fruit pulp in Zimbabwe. International Journal of Food Microbiology, 120(1–2), 159–166.

Ong, Y. Y., Tan, W. S., Rosfarizan, M., Chan, E. S., & Tey, B. T. (2012). Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Fermented Red Dragon Fruit Juices. Journal of Food Science 77(10): M560-M564.

Ortiz, M. E., Bleckwedel, J., Raya, R. R., & Mozzi, F. (2013). Biotechnological and in situ food production of polyols by lactic acid bacteria. Applied Microbiology and Biotechnology, 97(11), 4713–4726.

Owusu-Kwarteng, J., Akabanda, F., Nielsen, D. S., Tano-Debrah, K., Glover, R. L. K., & Jespersen, L. (2012). Identification of lactic acid bacteria isolated during traditional fura processing in Ghana. Food Microbiology, 32(1), 72–78.

Oyedeji, O., Ogunbanwo, S. T., & Onilude, A. A. (2013). Predominant Lactic Acid Bacteria Involved in the Traditional Fermentation of Fufu and Ogi, Two Nigerian Fermented Food Products. Food and Nutrition Sciences, 4(11), 40–46.

Palomino-Camargo, C., & González-Muñoz, Y. (2014). Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. Rev Peru Med Exp Salud Pública, 31(3), 535–546.

Papagianni, M. (2012). Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of industrially important compounds. Computational and Structural Biotechonology Journal, 3(4), 1–8.

Patel, A. R., Shah, N. P., & Prajapati, J. B. (2012). Antibiotic Resistance Profile of Lactic Acid Bacteria and Their Implications in Food Chain. World Journal of Dairy & Food Sciences, 7(2), 202–211.

Patel, S., Majumder, A., & Goyal, A. (2012). Potential of exopolysaccharides from lactic acid bacteria. Indian Journal of Microbiology 52(1): 3 -12.

Patra, F., Tomar, S. K., & Arora, S. (2009). Technological and functional applications of low-calorie sweeteners from lactic acid bacteria. Journal of Food Science, 74(1).

Pessione, E. (2012). Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: lights and shadows. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2(June), 1–15.

Pisano, M. B., Patrignani, F., Cosentino, S., Guerzoni, M. E., Franz, C. M. A. P., & Holzapfel, W. H. (2010). Diversity and functional properties of *Lactobacillus plantarum*- group strains isolated from Italian cheese products. Dairy Science & Technology, 65–76.

Pot, B., Ludwig, W., Kersters, K., & Schleifer, K-H. (1994). Taxonomy of Lactic Acid Bacteria. En De Vuyst, L., & Vandamme, E. J. (eds), Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Microbiology, Genetics and Applications (pp. 13-90). New York. Springer Science+Business Media.

Quinto, E. J., Jiménez, P., Caro, I., Tejero, J., & Mateo, J. (2014). Probiotic Lactic Acid Bacteria : A Review. Food and Nutrition Sciences, 5, 1765–1775.

Rachman, C., Kabadjova, P., Valcheva, R., & Dousset, X. (2004). Identification of *Carnobacterium* Species by Restriction Fragment Length Polymorphism of the 16S-23S rRNA Gene Intergenic Spacer Region and Species-Specific PCR. Applied and Environmental Microbiology, 70(8), 4468–4477.

Rachman, C. N., Kabadjova, P., Prévost, H., & Dousset, X. (2003). Identification of *Lactobacillus alimentarius* and *Lactobacillus farciminis* with 16S-23S rDNA intergenic spacer region polymorphism and PCR amplification using species-specific oligonucleotide. Journal of Applied Microbiology, 95(6), 1207–1216.

Ramírez, J., Ulloa, P., Velázquez, M., Ulloa, J., & Arce, F. (2011). Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. Revista Fuente, Año 2(7), 16.

Ramos, C. L., Thorsen, L., Schwan, R. F., & Jespersen, L. (2013). Strain-specific probiotics properties of *Lactobacillus fermentum, Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus brevis* isolates from Brazilian food products. Food Microbiology, 36(1), 22–29.

Reginensi, S. M., González, M. J., & Bermúdez, J. (2013). Phenotypic and genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from cow, ewe and goat dairy artisanal farmhouses. Brazilian Journal of Microbiology, 44(2), 427–430.

Robert, H., Gabriel, V., & Fontagné-Faucher, C. (2009). Biodiversity of lactic acid bacteria in French wheat sourdough as determined by molecular characterization using species-specific PCR. International Journal of Food Microbiology, 135(1), 53–59.

Rodas, A. M., Ferrer, S., & Pardo, I. (2003). 16S-ARDRA, a tool for identification of lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. Systematic and Applied Microbiology, 26(3), 412–422.

Rodicio, M. D. R., & Mendoza, M. D. C. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 22(4), 238–245.

Saavedra, S. (2017). Producción de ácido láctico a partir de *Lactobacillus* sp. aislado de frutos de la Región Loreto. (Tesis de pregrado). Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Mayor de San Marcos. Lima. Perú.

Sagdic, O., Ozturk, I., Yapar, N., & Yetim, H. (2014). Diversity and probiotic potentials of lactic acid bacteria isolated from gilaburu, a traditional Turkish fermented European cranberrybush (*Viburnum opulus* L.) fruit drink. Food Research International, 64, 537–545.

Saranya, S., & Hemashenpagam, N. (2011). Antagonistic activity and antibiotic sensitivity of Lactic Acid Bacteria from fermented dairy products. Advances in Applied Science Research, 2(4), 528–534.

Sedano, J. L. (2006). Selección de cepas nativas de Lactobacillus con actividad inhibitoria y tolerantes al etanol aisladas de "masato" (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

Serpen, J. Y. (2012). Comparison of Sugar Content in Bottled 100 % Fruit Juice versus Extracted Juice of Fresh Fruit. Food and Nutrition Science, 3(November), 1509–1513.

Sharma, P., Tomar, S. K., Goswami, P., Sangwan, V., & Singh, R. (2014). Antibiotic resistance among commercially available probiotics. Food Research International, 57, 176–195.

Sharma, P., Tomar, S. K., Sangwan, V., Goswami, P., & Singh, R. (2016). Antibiotic Resistance of *Lactobacillus sp*. Isolated from Commercial Probiotic Preparations. Journal of Food Safety, 36(1), 38–51

Sheeladevi, A., & Ramanathan, N. (2012). Lactic Acid Production Using Lactic Acid Bacteria under Optimized Conditions. International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives, 2(6), 1681–1691.

Siezen, R. J., & van Hylckama Vlieg, J. E. (2011). Genomic diversity and versatility of *Lactobacillus plantarum*, a natural metabolic engineer. Microbial Cell Factories, 10(Suppl 1), S3.

Silva, B. C., Sandes, S. H. C., Alvim, L. B., Bomfim, M. R. Q., Nicoli, J. R., Neumann, E., & Nunes, A. C. (2017). Selection of a candidate probiotic strain of *Pediococcus pentosaceus* from the faecal microbiota of horses by *in vitro* testing and health claims in a mouse model of *Salmonella* infection. Journal of Applied Microbiology, 122(1), 225–238.

Singh, B. K. (2010). Exploring microbial diversity for biotechnology: The way forward. Trends in Biotechnology, 28(3), 111–116.

Siroli, L., Patrignani, F., Serrazanetti, D. I., Tabanelli, G., Montanari, C., Gardini, F., & Lanciotti, R. (2015). Lactic acid bacteria and natural antimicrobials to improve the

safety and shelf-life of minimally processed sliced apples and lamb's lettuce. Food Microbiology, 47, 74–84.

Sogin, M., Morrison, H., Huber, J., Welch, D., Huse, S., Neal, P., & Herndl, G. (2011). Microbial Diversity in the Deep Sea and the Underexplored "Rare Biosphere." Handbook of Molecular Microbial Ecology II: Metagenomics in Different Habitats, (30), 243–252.

Soto, L. P., Frizzo, L. S., Bertozzi, E., Avataneo, E., Sequeira, G. J., & Rosmini, M. R. (2010). Molecular microbial analysis of *Lactobacillus* strains isolated from the gut of calves for potential probiotic use. Veterinary Medicine International, 2010, 274987.

Sozzi, T., & Smiley, M. (1980). Antibiotic Resistance of Yogurt Starter Cultures *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. Applied and Environmental Microbiology, 40(5), 862–865.

Stefanis, C., Mantzourani, I., Plessas, S., Alexopoulos, A., Galanis, A., Bezirtzoglou, E., & Varzakas, T. (2016). Reviewing Classical and Molecular Techniques Regarding Profiling of Probiotic Character of Microorganisms. Current Research in Nutrition and Food Science Journal, 4(1), 27–47.

Stiles, M.E., **&** Holzapfel, W. H. (1997) Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. International Journal of Food Microbiology, 36(1):1–29.

Sun, Z., Yu, J., Dan, T., Zhang, W., & Zhan H. (2014). Phylogenesis and Evolution of Lactic Acid Bacteria. En Zhang, H., & Cai, Y. (eds), Lactic Acid Bacteria: Fundamentals and Practice. (pp. 1-102). New York. Springer.

Tamang, B., Tamang, J. P., Schillinger, U., Franz, C. M. A. P., Gores, M., & Holzapfel, W. H. (2008). Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from ethnic fermented bamboo tender shoots of North East India. International Journal of Food Microbiology, 121(1), 35–40.

Teuber, M. (1993). Lactic Acid Bacteria. En Rehm, H-J., & Reed, G. (eds), Biotechnology: A comprehensive treatise in 8 volumes. (pp. 325–366). VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim. Federal Republic of Germany.

Thunell, R. K. (1995). Taxonomy of the leuconostocs. Journal of Dairy Sciences. 78:2514–22.

Tieking, M., Korakli, M., Ehrmann, M. A., Gänzle, M. G., & Vogel, R. F. (2003). In situ production of exopolysaccharides during sourdough fermentation by cereal and intestinal isolates of lactic acid bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 69(2), 945–952.

Torriani, S., Felis, G. E., & Dellaglio, F. (2001). Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by recA Gene Sequence Analysis and Multiplex PCR Assay with recA Gene-Derived Primers. Applied and Environmental Microbiology, 67(8), 3450–3454.

Trias, R., Bañeras, L., Badosa, E., & Montesinos, E. (2008). Bioprotection of Golden Delicious apples and Iceberg lettuce against foodborne bacterial pathogens by lactic acid bacteria. International Journal of Food Microbiology, 123(1–2), 50–60.

Tripathi, C., K., M. Tripathi, D., Praveen, V., & Bihari, V. (2007). Microbial Diversity – Biotechnological and industrial perspectives. Indian Journal of Experimental Biology, 45:326 – 332.

Tsiamis, G., Karpouzas, D., Cherif, A., & Mavrommatis, K. (2014). Microbial diversity for biotechnology. BioMed Research International, 2014.

Valdéz, J. C., Peral, M. C., Rachid, M., Santana, M., & Perdigón, G. (2005). Interference of *Lactobacillus plantarum with Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in infected burns: The potential use of probiotics in wound treatment. Clinical Microbiology and Infection, 11(6), 472–479.

Versalovic, J., Schneider, M., Bruijn, F. J. de, & Lupski, J. R. (1994). Genomic fingerprint of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. Methods in Molecular and Cellular Biology, 5: 25-40.

Vlková, E., Rada, V., Popelářová, P., Trojanová, I., & Killer, J. (2006). Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria isolated from gastrointestinal tract of calves. Livestock Science, 105(1–3), 253–259.

Wakil, S. M., & Ajayi, O. O. (2013). Production of lactic acid from Starchy-based food substrates. Journal of Applied Biosciences, 71, 5673– 5681.

Wang, J., Zhao, X., Tian, Z., Yang, Y., & Yang, Z. (2015). Characterization of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW11 isolated from Tibet Kefir. Carbohydrate Polymers, 125, 16–25.

Weinberg, Z. G., & Ashbell, G. (2003). Engineering aspects of ensiling. Biochemical Engineering Journal, 13, 181–188.

Yien Ong, Y., Siang Tan, W., Rosfarizan, M., Chan, E. S., & Ti Tey, B. (2012). Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Fermented Red Dragon Fruit Juices. Journal of Food Science, 77(10).

Zavaleta, A. I., Martínez-Murcia, A. J., & Rodríguez-Valera, F. (1996). 16S-23S rDNA intergenic sequences indicate that *Leuconostoc oenos* is phylogenetically homogeneous. Microbiology, 142(8), 2105–2114.

Zdolec, N., Filipovi, I., Fleck, Ž. C., Mari, A., Jankuloski, D., Koza, L., & Njari, B. (2011). Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria isolated from fermented sausages and raw cheese. Veterinarski Archiv, 81(1), 133–141.

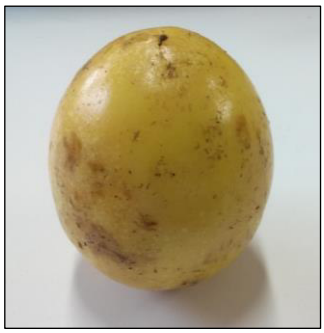
Zeng, Y. H., Koblížek, M., Li, Y. X., Liu, Y. P., Feng, F. Y., Ji, J. D., & Wu, Z. H. (2013). Long PCR-RFLP of 16S-ITS-23S rRNA genes: A high-resolution molecular tool for bacterial genotyping. Journal of Applied Microbiology, 114(2), 433–447.

Zhou, J. S., Pillidge, C. J., Gopal, P. K., & Gill, H. S. (2005). Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. International Journal of Food Microbiology (Vol. 98).

CAPITULO VII. ANEXOS

ANEXO 1

Frutos procedentes de la Región Loreto utilizados para el aislamiento de BAL



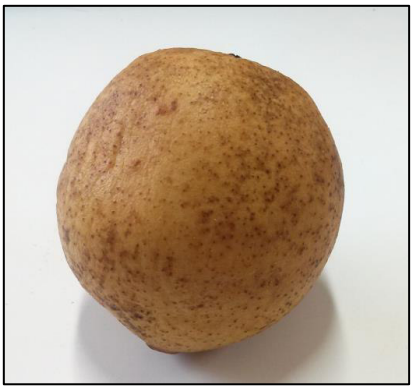
Passiflora edulis
(Maracuyá)

Psidium guajava
(Guayaba)

Poraqueiba sericea
(Umari)

Bactris gasipaes
(Pijuayo)

Citrus paradisi
(Toronja)



Genipa americana
(Huito)

Anacardiun occidentale
(Casho)

ANEXO 1 (cont.)

Frutos procedentes de la Región Loreto utilizados para el aislamiento de BAL

Averroa carambola
(Carambola)

Solanum sessiliflorum
(Cocona)

Passiflora nitida
(Granadilla)

Mauritia flexuosa
(Aguaje)

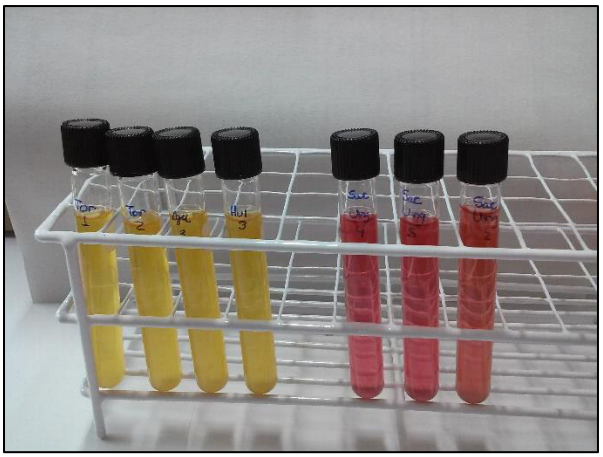
Mauritiella aculeata
(Aguajillo)

Oenocarpus batana
(Ungurahui)

Myrciaria dubia
(Camu Camu)

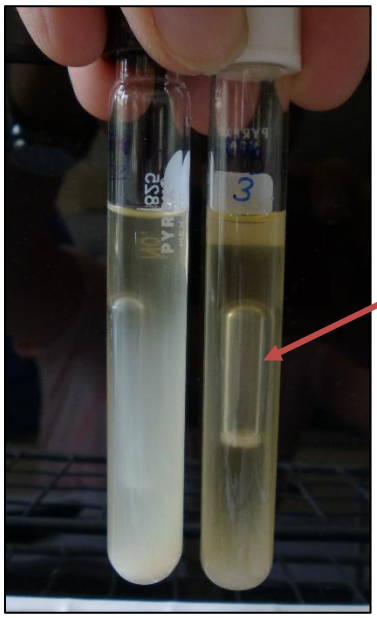
ANEXO 2

Pruebas nutricionales



Fermentación de carbohidratos en Caldo Rojo de Fenol

(Amarillo, positivo; Rojo, negativo)



Producción de CO_2 a partir de glucosa

(Izquierda, negativo; Derecha, positivo)

ANEXO 3

Composición del medio MRS (g/L)

Peptona de caseína	10,00
Extracto de carne	10,00
Extracto de levadura	4,00
Glucosa	20,00
Tween 80	0,80
Fosfato de potasio (K_2HPO_4)	2,00
Citrato dibásico de amonio ($C_6H_8O_7 * 2NH_3$)	2,00
Acetato de sodio	5,00
Sulfato de magnesio heptahidratado	0,20
Sulfato de manganese monohidratado	0,04

pH 5,6 – 5,9

Para preparar agar añadir entre 1,5 % a 2,0 % de agar agar

ANEXO 4

Reactivos y soluciones utilizados en la extracción de ADN y electroforesis

Buffer TE 1X (Extracción de ADN)

10 mM Tris . Cl (pH 8)

1 mM EDTA (pH 8)

Buffer TBE 10X (electroforesis)

Tris base	107 g
Boric acid	55 g
0.5M EDTA (pH 8)	40 ml

Añadir agua destilada para ajustar el volumen a 1 L

Buffer de carga (electroforesis)

Para 10 mL

Azul de bromofenol	10 mg
Glicerol	5 mL
TBE 1X	1 mL
Agua MiliQ	4 mL